

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-201688

(P2000-201688A)

(43)公開日 平成12年7月25日(2000.7.25)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 12 N 15/09  
C 07 K 14/72  
C 12 N 5/10  
C 12 P 21/02  
C 12 Q 1/02

識別記号

Z N A

F I

C 12 N 15/00  
C 07 K 14/72  
C 12 P 21/02  
C 12 Q 1/02  
C 12 N 5/00

マークコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 3  
C 4 B 0 6 4  
4 B 0 6 5  
B 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平11-98787

(71)出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72)発明者 大下 博文

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ  
クノサービス株式会社内

(72)発明者 徐 明旭

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ  
クノサービス株式会社内

(74)代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エストロジエンレセプター遺伝子およびその利用

(57)【要約】

【課題】 化学物質のエストロジエン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するための試験系を提供可能とするこ  
と。

【解決手段】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有す  
る蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子  
等。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項2】配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項3】配列番号2で示される塩基配列を有するエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項4】配列番号4で示される塩基配列からなるエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項5】請求項1～4記載のエストロジエンレセプター遺伝子を含有するベクター。

【請求項6】エストロジエンレセプター遺伝子に宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項5記載のベクター。

【請求項7】請求項1～4記載のエストロジエンレセプター遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項8】請求項5または6記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項9】宿主細胞が動物細胞である請求項7または8記載の形質転換体。

【請求項10】請求項7～9記載の形質転換体を培養してエストロジエンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジエンレセプターの製造方法。

【請求項11】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジエンレセプター。

【請求項12】化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジエン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と請求項1～4記載のエストロジエンレセプター遺伝子とがエストロジエンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジエンレセプター活性化能の評価方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エストロジエンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロジエン様作用を示すことが報告されている。かかる化学物質の作用はヒトのホルモンバランスを崩し、疾患の原因となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロジエン様作用を測定する試みがなされている。エストロジエンの作用機序として、エストロジエンがエストロジエンの標的細胞に存在するエストロジエンレセプターに結合すると、該レセプターは活

性化され、染色体上のエストロジエン応答配列に結合して該配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロジエン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するための試験系の開発が切望されている。

## 【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物であるメダカのエストロジエンレセプターをコードする遺伝子を見出し、本発明に至った。即ち、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする該遺伝子、配列番号2で示される塩基配列を有する該遺伝子、配列番号4で示される塩基配列からなる該遺伝子、該遺伝子を含有するベクター（以下、本発明ベクターと記す。）、該遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体（以下、本発明形質転換体と記す。）、該形質転換体を培養してエストロジエンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジエンレセプターの製造方法、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジエンレセプター、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジエン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と本発明遺伝子とがエストロジエンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジエンレセプター活性化能の評価方法、を提供するものである。

## 【0004】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明遺伝子は、例えば、ヒメダカ等のメダカから、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著；モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバー ラボラトリ（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的方法に準じて取得することができる。具体的には、まず、ヒメダカ等のメダカからRNAを調製する。例えば、ヒメダカの内臓を塩酸グアニジンやグアニジンチオシアネート等の強力な蛋白質変性剤を含む溶液中で粉碎し、さらに該粉碎物にフェノール、クロロホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる。変性蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収された可溶性画分から、塩酸グアニジン／フェノール法、SDS-フェノール法、グアニジンチオシアネート／CSC法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市販のRNA調製用キットとしては、例えばISOGEN（ニッポンジーン製）がある。得られた全RNAを錆型として使用し、該RNAにオリゴdTプラ

イマーをアニールさせた後に逆転写酵素を作用させることにより一本鎖cDNAを合成し、次いで、該一本鎖cDNAに大腸菌RNAseHおよび大腸菌のDNAポリメラーゼIを作用させて二本鎖のcDNAを合成する。更に該cDNAの両末端をT4DNAポリメラーゼにより平滑化する。得られたcDNAはフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製し、回収する。なお、これらの方法に基づいた市販のcDNA合成用キットとしては、例えばcDNA合成システムプラス（アマシャム社製）がある。このようにして得られたcDNAを例えば、プラスミドpUC118やファージ入gt11などのベクターにリガーゼを用いて挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。次に、このようなcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNA断片をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR法により、本発明遺伝子を取得することができる。また、上記のようにして調製された全RNAを鑄型に使用して逆転写反応を行なった後、得られたDNAを鑄型にしてPCRを行なうことにより（RT-PCR法）本発明遺伝子を取得することもできる。上記のPCR法またはRT-PCR法においてPCRにより本発明遺伝子を増幅する際に用いるプライマーとしては、例えば、20bpから40bp程度の長さでかつGまたはC塩基の割合が10%から70%程度の塩基配列を、配列番号2で示される塩基配列の5'末端領域および3'末端領域からそれぞれ選択し、該塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成するとよい。具体的には、例えば、フォワードプライマーの塩基配列としては5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3'や5'-AAG CTTCA GAG TAA GAG ACA GAG C-3'があげられ、リバースプライマーの塩基配列としては5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3'があげられる。このようにしてPCRで増幅された本発明遺伝子は、例えば、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著；モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には例えば、TAクローニングキット（Invitrogen社）やpBluescriptII（Stratagene社）などの市販のプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。尚、本発明遺伝子は、配列番号2や配列番号4で示される塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法（Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984）等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することができる。得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam Gilbert法（例えば、Maxam, A.M & W.Gilbert, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 74, 5

60, 1977 等に記載される）やSanger法（例えばSanger, F. & A.R.Coulson, J.Mol.Biol., 94, 441, 1975, Sanger, F. & Nicklen and A.R.Coulson., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 74, 5463, 1977等に記載される）に準じて解析することにより確認することができる。

【0005】このようにして取得される本発明遺伝子を、例えば、宿主細胞内で複製可能なDNAであって、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマークー遺伝子をもつベクターに、通常の遺伝子工学的手法を用いて組込むことにより本発明ベクターを構築することができる。本発明ベクターの構築に用いることができるベクターとしては、具体的には、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合、例えば、プラスミドpUC119（宝酒造（株）製）や、ファージミドpBluescriptII（ストラタジーン社製）等をあげることができ、酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミドpACT2（Clontech社製）などをあげることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合は、pRC/PSV、pRC/CMV（Invitrogen社製）等のプラスミド、ウシパピローマウイルスプラスミドppBPV（ファルマシア社製）、EBウイルスプラスミドpCEP4（Invitrogen社製）等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫類動物細胞（以下、昆虫細胞と記す。）を宿主細胞とする場合は、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同的な塩基配列を含有するトランスマーカーべクターを用いる。このようなトランスマーカーべクターの具体的例としては、Pharmingen社から市販されているpVL1392, pVL1393 (Smith, G.E., Summers M.D. et al.: Mol.Cell.Biol., 3:2156-2165, 1983)、pSFB5(Funahashi, S. et al., J.Viro., 65:5584-5588, 1991)などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスマーカーべクターに挿入し、該トランスマーカーべクターとウイルスゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスマーカーべクターとウイルスゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上に組み込まれたウイルスを得ることができる。ウイルスゲノムとしては、Baculovirus、Adenovirus、Vaccinia virusなどのゲノムを用いることができる。本発明遺伝子の上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のようなベクターに組み込むことにより、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクター（以下、本発明発現ベクターと記す。）を構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明遺伝子が導入される宿主細胞においてプロモーターの制御下に発現するように、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。使用するプロモーターは、形質転換する宿主細胞内でプロモータ

一活性を示すものであれば特に制限はなく、例えば、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合は、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合はADH1プロモーターなどをあげることができる。また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有するベクターを使用する場合は、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で結合するよう、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミドpRC/RSV,pRC/CMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、該クローニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞へ導入すれば、本発明遺伝子が発現する。これらのプラスミドにはあらかじめSV40の自律複製起点 (ori) が組み込まれているため、ori(-)のSV40ゲノムで形質転換された培養細胞、例えばCOS細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また、前述の酵母用プラスミドpACT2はADH1プロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体のADH1プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えばG1945 (Clontech社製) 等の出芽酵母内で大量発現させることができ本発明ベクターが構築できる。

【0006】上述のようにして構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法は、形質転換される宿主細胞に応じて通常用いられる方法でよい。例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J.Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー、1989年) 等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を用いることができ、酵母菌を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法に基づくYeast transformation kit(Clontech社製)などを用いてベクターを導入することができる。また、哺乳類動物細胞や昆虫細胞等の動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等により該宿主細胞に本発明ベクターを導入することができる。尚、ウイルスをベクターに用いる場合は、上述のような一般的な遺伝子導入法によりウイルスゲノムを宿主細胞に導入できるほか、ウイルスゲノムを含有するウイルス粒子を宿主細胞へ感染させることによってもウイルスゲノムを宿主細胞に導入することができる。

【0007】本発明形質転換体の選抜は、導入された本発明ベクターが有する検出マーカー遺伝子の性質に応じた方法を用いればよい。例えば、検出マーカー遺伝子が、細胞致死活性を示す薬剤に対する耐性遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。このようにして用いることのできる薬剤耐性遺伝子と選抜薬剤との組み合せとしては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子とネオマイシンとの組合せ、ハイグロマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシンとの組み合せ、ブラストサイジンS耐性遺伝子とブラストサイジンSとの組合せ等をあげることができる。また、検出マーカー遺伝子が、宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。さらに、本発明発現ベクターを導入した場合は、エストロジェン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターを制限酵素等で消化することにより直鎖上にした後、これを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入された本発明ベクターにコードされる検出マーカーを指標にして目的とする形質転換体を選抜すればよい。例えば、上記のような選択薬剤に対する耐性遺伝子を検出マーカー遺伝子として持つ本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、選択薬剤を添加した培地で数週間以上該細胞を維代培養して、コロニー状に生き残った選択薬剤耐性クローンをピペットで吸い上げ純化することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得することができる。該形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができる、一過性の遺伝子導入株と比較して、形質転換体作製の手間を省くことができ、形質転換体の性能を一定に保つこともできる。

【0008】上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することにより本発明のエストロジェンレセプターを産生させることができる。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養すればよい。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養（試験管振とう式培養、往復式振とう培養、ジャーファーメンター (Jar Fermenter) 培養、タンク培養等）等が可能である。培養温度は、微生物が生育する範囲で適宜変更でき、例えば、約15°C～約40°Cの培養温度、約6～約8の培地pHで培養するとよい。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約1～約5日間である。また、上記形質転換体が動物細胞である場合、一般的の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養すればよい。選

選択薬剤を利用して当該形質転換体を選抜した場合は、対応する選択薬剤を共存させて培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば10v/v%となるようFBSを添加したDMEM培地等の培地を用いて、37°C、5v/v%CO<sub>2</sub>存在下等にて、培地を数日ごとに交換しながら培養する。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、0.25w/v%程度のトリプシンPBS溶液を用いて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しい培養容器に播種し培養を続ける。目的とする量まで細胞が増殖したら細胞を集め、昆虫細胞の場合も同様に、10v/v%FBSおよび2w/v%Yeast tateを含むGrace's medium等の昆虫細胞用培地を用いて25°Cから35°Cで継代培養する。ただし、Sf21細胞などの培養容器からはがれやすい細胞の場合は、トリプシン液ではなくビベッティングにより細胞を分散させ継代を行なう。また、Baculovirus等のウイルスベクターを含む形質転換体の場合は、細胞質効果により細胞が死滅する前、例えば培養開始から72時間目までに培養を終了することが好ましい。本発明形質転換体により產生されたエストロジエンレセプターの回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせて行えば良く、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、該細胞を通常のバッファー、例えば、20mMHEPES pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSFからなるバッファー等に懸濁した後、ポリトロン、超音波、ダウンスホモジナイザー等を用いて細胞を破碎し、破碎液を数万xgで数十分から1時間程度超遠心分離し、上清画分を回収することにより、エストロジエンレセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製されたエストロジエンレセプターを回収することもできる。この際、後述のエストロジエンレセプターが結合する塩基配列を含む15bpから200bp程度の長さのオリゴヌクレオチドをプローブとしたDNA結合アッセイなどにより、目的とするエストロジエンレセプターを含む画分を見分けることができる。このようにして製造された本発明のエストロジエンレセプターは、例えば、エストロジエンレセプターに対する化学物質の親和性を測定するためのラジオレセプターアッセイ等に用いることができる。

【0009】上述のようにして構築された本発明発現ベクターは、例えば、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイに利用することができる。具体的には、エストロジエン応答配列を有しエストロジエンレセプターにより転写が制御される遺伝子、例えばビテロジエン遺伝子の転写制御領域の下流にレポーター遺伝子を結合させたキメラ遺伝子、または、エストロジエン応答配列の下流に転写開始に必要な塩基配列とレポーター遺伝子とを結合させたキメラ遺伝子（以下、本キメラ遺伝子と記す。）を、細胞内でのエストロジエンレセプターの転写調節能をモニタ

一するためのレポーター遺伝子として用いる。エストロジエン応答配列（estrogen response element）とは、エストロジエンにより転写が制御される遺伝子のプロモーターの上流に存在し、エストロジエンレセプターによって認識される塩基配列を意味する。エストロジエンの結合したエストロジエンレセプターは活性化されてエストロジエン応答配列に結合することにより、該配列の下流にある遺伝子の転写を促進する。エストロジエン応答配列のコンセンサス配列としては、塩基配列 AGGTCA<sub>n</sub> TGACCT (<sub>n</sub>は、A、G、C、またはTを意味する。) が一般に知られている。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリファースファターゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子などが利用できる。上述のように作製した本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子を組み込んだベクターとを、内在性のエストロジエンレセプターを產生していない宿主細胞、例えばHeLa細胞やNIH3T3細胞などに導入し形質転換体を取得する。この形質転換体をそのまま1日から数日間培養する間に、例えばエストロジエン様作用をもつ化学物質を培地中に加えて前記形質転換体に作用させる。該形質転換体が产生するエストロジエンレセプターが化学物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子のmRNAへの転写が促進され、ルシフェラーゼ酵素蛋白質が形質転換体の細胞内に蓄積する。この状態の形質転換体を破碎して細胞粗抽出物を調製し、レポーターの酵素活性等を指標にして細胞当たりのレポーター蛋白質の量を求める。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、前記細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると発光し、発光量はルシフェラーゼ量に比例する。従って、この発光量をルミノメーター等の測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量がわかり、よって、その際に添加されていた化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価することができる。また、本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子が組み込まれたベクターとを同時に宿主細胞に導入して、本発明遺伝子および本キメラ遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得し、上記レポーターアッセイに用いてもよい。該形質転換体は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することできるので、これを一旦取得すると、アッセイの度ごとにこれらの遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要が無く、また、形質転換体の性能を一定に保つこともできることから、例えばハイスクロットスクリーニング等の自動化された大規模スクリーニングを実施する際に有用である。

【0010】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるもの

ではない。

【0011】実施例1（本発明遺伝子の取得）

餌（コイ稚魚用）にβ-エストラジオール（和光純薬工業株式会社製）10mg/lを10mg/g餌となるように添加し、これにアセトンを加えてよく混和した後、ヘアードライヤーの下でアセトンを除去した。こうして得た処理餌を、約3ヶ月のヒメダカ雌10個体に3回／日の頻度で1日間飽食量与えた。β-エストラジオール投与24時間後に、これらのヒメダカから内臓を摘出し、直ちに組織1

XU1 : 5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3' (22mer, GC/AT = 13/9)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター)にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー(XU1, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ERにクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号2で示される塩基配列が明らか

XU36 : 5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3' (25mer, GC/AT = 11/14)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター)にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER2)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー(XU36, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ER2にクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号4で示される塩基配列が明らかとなった。

【0012】実施例2（本発明遺伝子発現用ベクターの構築）

実施例1で得られたプラスミドpCR-ERからエストロジエンレセプター遺伝子をXba IとHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRc/RSVに組み込み、エストロジエンレセプターを発現させるための発現

オリゴヌクレオチド1:

5'-CCA AAG TCA GGT CAC AGT GAC CTG ATC AAA GGA AC-3'

オリゴヌクレオチド2:

5'-CTT TGA TCA GGT CAC TGT GAC CTG ACT TTG GGT TC-3'

両オリゴヌクレオチドの末端をカイネーションによりリン酸化した。カイネーション反応液は、10 nmolのオリゴヌクレオチド1または10 nmolのオリゴヌクレオチド2、5 $\mu$ lの10 X カイネーションバッファー、1 $\mu$ lの10 mMのATP、2.5 $\mu$ lのポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）を1.5 ml容チューブに採り、滅菌蒸留水を加え全量を50 $\mu$ lとして調製した。カイネーション反応は37°Cで1時間行った。反応終了後、リン酸化したオリゴヌクレオチド1とオリゴヌクレオチド2をアニーリングさせ、2本鎖のEREを得た。アニーリング反応液は、リン酸化させたオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2のそれぞれ20 $\mu$ lずつを、1.5 ml容チュ

gあたり10mlのトリゾール試薬を加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離した。水相を採取してイソプロパノールを加えRNAを沈澱させた。約0.3g 約500 $\mu$ gのRNAが得られた。このようにして調製したRNA 1 $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30°Cで10分間逆転写反応を行い、引き続き42°Cで50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー（XU1とXU14）を用いPCR (30サイクル、94°C 30sec-1min、50-60°C 1-1.5min、72°C 1-3min)を行った。

XU1 : 5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3' (22mer, GC/AT = 13/9)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

となった。また、上記のようにして調製したRNA1 $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30°Cで10分間逆転写反応を行い、引き続き42°Cで50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー（XU36とXU14）を用いPCR (30サイクル、94°C 30sec-1min、50-60°C 1-1.5min、72°C 1-3min)を行った。

XU36 : 5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3' (25mer, GC/AT = 11/14)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

ベクターRSV-ERを構築した。具体的な過程を図1に、発現ベクターRSV-ERの構造の詳細を図2示す。また、同様にして、実施例1で得られたプラスミドpCR-ER2からエストロジエンレセプター遺伝子をXba IとHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRc/RSVに組み込み、エストロジエンレセプターを発現させるための発現ベクターRSV-ER2を構築した。

【0013】実施例3（エストロジエンレセプターに応答するレポーター遺伝子を有するベクターの構築）

既知のセノアスのA2ビテロジエン遺伝子（GenBank Accession No. X00205）の5'末端領域のエストロジエン応答配列（以下、EREと記す。）のコンセンサス配列をもとに、下記のオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2を合成した。

一端に加え、95°Cで5分間保温し、60°C、次いで37°Cにてそれぞれ1時間保温した後、室温で約1時間放置した。反応終了後、10 $\mu$ lのアニーリング反応液に10 $\mu$ lのDNAリガーゼ（ライゲーションキット、宝酒造社製）を加え、2本鎖のERE断片を連結した。反応液をアガロースゲル電気泳動に供してDNA断片の長さを分析し、ERE断片が4個連結されたと判断されるDNA断片（以下、4 X ERE断片と記す。）およびERE断片が5個連結されたと判断されるDNA断片（以下、5 X ERE断片と記す。）をそれぞれ回収した。これらのDNA断片をプランティングキット（宝酒造社製）を用い、末端を平滑化した。一方、pBluescript(SK-)を制限酵素EcoR I（宝酒

造社製)で切断し、5'末端をアルカリフィオスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。前記のDNA断片(4 X ERE断片または5 X ERE断片)とpBluescript(SK-)とをそれぞれDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンビテントセル(東洋紡社製)を形質転換してアンピシリン耐性となつた株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、塩基配列を ABI PRISM™ 377 DNA Sequence System(バーキンエルマージャパン社製)で確認した。次に、HSV tkプロモーター配列を持つベクター-pTK $\beta$ (クロントック)を制限酵素Sal IおよびXba I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断した後アガロースゲル電気泳動で分析し、約1-kbpのtkプロモーター断片を得た。該断片をブランディングキットを用い、末端を平滑化した。一方、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポータープラスミド pGL-3(ピッカジーン)を制限酵素Sma I(宝酒造社製)で切断し、5'末端をアルカリフィオスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。2つのDNA断片をDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンビテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となつた株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、tkプロモーター挿入したレポータープラスミド(tk-pGL-3)を取得した。次に、上記の4 X ERE断片が挿入されたpBluescriptを制限酵素Kpn IおよびXba I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断し、アガロースゲル電気泳動で4 X ERE断片を回収した。一方、tk-pGL-3をKpn IおよびNhe I(いずれも宝酒造社製)で消化し、5'末端をアルカリフィオスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。このようにして調製された4 X ERE断片とtk-pGL-3とをDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ 株のコンビテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となつた株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、4 X ERE断片およびtkプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE-tk-pGL)を取得した。該プラスミドの構築の過程を図3に、該プラスミドの構造を図4に示す。また、同様にして、上記の5 X ERE断片が挿入されたpBluescriptから5 X ERE断片を回収し、該断片と、Kpn IおよびNhe Iで消化されたtk-pGL-3とを結合させ、5 X ERE断片およびtkプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE5-tk-pGL)を取得した。

**【0014】実施例4(プラスミドDNAの大量調製)**  
実施例2で得られた発現ベクター-RSV-ER、レポータープラスミドERE-tk-pGLおよびERE5-tk-pGL、ならびにコントロールレポータープラスミドであるpRL-tk(ピッカジーン)のDNAを以下の方法により大量に調製した。上記プラスミドを含む大腸菌をアンピシリン(終濃度50  $\mu$ g/ml)を含有LB培地3mlに植菌し、37°Cで一晩振動培養した。そ

の培養液をアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)を含むLB培地200mlに植菌し、一晩振動培養した。一晩培養後の菌体を5,000 rpm、10分間、4°Cで遠心分離し(CR21、日立工機)、得られた沈殿を0.1 MのSTEバッファー60 mlに懸濁し、同条件で再度遠心分離した。沈殿を3 mlのsolution 1に懸濁し、1 mlのリゾチーム(20 mg/ml)を加え、室温で5分間放置した。引き続き10 mlのsolution 2を加え、氷上に10分間放置した後、7.5 mlのsolution 3を加え、氷上に15分間放置した。12,000 rpm、20分、4°Cで遠心分離し、上清を50 mlチューブに移し、0.6容量のイソプロピルアルコールを加え、室温で15分間放置した。3,000 rpm、10分間、室温で遠心分離(CR5DL、日立工機)、70%エタノールで洗浄し、乾燥させた。沈殿を4.2 mlのTEバッファーに溶かし、5 mg/ml RNase溶液(ニッポンジーン)を28  $\mu$ l加え、50°C、30分間インキュベートした。2 mg/mlエチジウムプロマイド溶液400  $\mu$ lとCsCl(関東化学)4.6 gを加えた後、日立工機シールチューブに移し、55,000 rpm、20°C、16時間遠心分離(SCPS5H2、日立工機)した。スーパーコイルプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、55,000 rpm、20°C、16時間再度遠心分離した。再びスーパーコイルプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、水飽和イソアミルアルコールでエチジウムプロマイドを完全に除き、一晩5 mM STEバッファーに透析した後、試料として用いた。

**【0015】実施例5(細胞の培養)**

不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)を活性炭-デキストランで処理し、細胞培養の培地作製に用いた。処理過程における各ステップは以下の通りであった。25 Mスクロース(和光純薬)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>(和光純薬)、10 mM HEPES(pH7.4)(同仁化学、熊本)1L中にノーリットEXW(ナカライトスク)2.5gとデキストランT-70(ファルマシアバイオテク、スウェーデン)0.25gを懸濁し、4°Cで終夜攪拌した。本懸濁液を12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させた。これを不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)1Lに懸濁し、4°Cで終夜攪拌した。その後、12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させ、取り除いた。以上の操作を2回繰り返した後、ザルトラブV500(0.20  $\mu$ m、ザルトリウス、独國)を用いてフィルタろ過したろ液を活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清とした。ヒト子宮癌細胞株HeLa(大日本製薬)を、10%活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清、0.03% L-グルタミン(日本製薬)および0.15%炭酸水素ナトリウムを添加したイーグルMEM(日本製薬)培地を用いて10 cmの組織培養用ディッシュ(ファルコン)に培養した。細胞の継代・播種は培地を除去後、適量のPBS(-)(日本製薬)で接着した細胞を洗浄し、PBS(-)80 mlに5%トリプシン(DIFCO、米国)10 ml、0.2%EDTA-3 Na(同仁化学)10 mlを添加した液を用いて細胞を剥離した。細胞の培養はすべて5% CO<sub>2</sub>および飽和湿度下、37°C

でCO<sub>2</sub>インキュベータ（アステック）内で培養した。

#### 【0016】実施例6（レポーター・アッセイ）

以下の操作を各条件ごとに4連で実験を行った。実施例5で培養した細胞の培地を除去し、PBS(-)で1回洗浄した。5%トリプシン(DIFCO,米国)5mlを加え、細胞を剥離した。細胞の計数した後24ウェルマルチウェルプレート(ファルコン)に播種した。細胞を1ウェルあたり4,000個のHeLa細胞を播種した。1ウェルあたり0.5mlの10%活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地を添加し翌日まで培養した。トランスフェクションは1ウェルあたり0.25~1.0μgのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.1~0.5μgのレポータープラスミドERE-tK-pGJまたはERE5-tK-pGL、および、0.05~0.1μgのコントロールレポータープラスミドpRL-tKを、0.35μl/ウェルのリポフェクチン(GIBCO-BRL)またはリポフェクタミン(GIBCO-BRL)を用いて、無血清培地中にて細胞に導入した。1ウェルあたりの培地量は200μlとした。導入方法は添付説明書に従った。各細胞をトランスフェクション培地中で5時間培養後に10%活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地に交換し、翌日まで培養を続けた。次いで、β-エストラジオール(和光純薬社製)をDMSO(関東化学)に溶解しイーグルMEM培地に溶かして、上述の細胞に添加した。β-エストラジオール終濃度は10pMから100nMの範囲とした。β-エストラジオール添加後の1ウェルあたりの培地量は1mlとした。β-エストラジオールを添加してから約28時間培養後、培地を除去し、β-エストラジオールに曝露した細胞をPBS(-)で2回洗浄した。ピッカジーンデュアルキット(東洋インキ)中の細胞溶解剤を超純水で5倍希釈したもの1ウェルあたり50μl添加し、室温で30分間放置して細胞を溶解した。方法はキットの添付説明書に従った。細胞溶解液10μlを白色96ウェルマルチウェルプレート(輝光測定用、ベルトールド、ドイツ)に移し、キット中の発光基質2種(ルシフェリン、セランテラジン)を順次添加し、それぞれの発光量をルミノメーター(ベルトールド、LB96P)で測定した。はじめに添加する発光基質はレポータープラスミドERE-tK-pGL由来のホタルルシフェラーゼによる発光を測定するために用い、後で添加する発光基質はコントロールレポータープラスミドpRL-tK由来のシーバンジールシフェラーゼによる発光を測定するために用いた。前者の発光量は化学物質が遺伝子の転写活性にあたえる影響を反映している。また、後者の発光量は内部標準として個々の実験データを補正するために用いる。

#### 【0017】実施例7(トランスフェクション条件の検討)

実施例6記載のレポーター・アッセイにおいて、トランスフェクションの際の各ウェルへのプラスミドの添加量と、リポフェクチンまたはリポフェクタミンの添加量について検討した。まず、各ウェルに、プラスミド(tK-p

GL-3)を0.2μgから1.2μg、リポフェクチンまたはリポフェクタミンを0.2μlから0.8μlの範囲で添加してトランスフェクションを行い、得られた細胞を培養して、実施例6記載の方法に準じてルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図5に示した。リポフェクチンを用いた場合には、リポフェクチン0.4μlとプラスミド0.4μgを加えたときに、リポフェクタミンを0.6μlとプラスミド0.4μg加えたときに、それぞれ最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。次に、リポフェクチンまたはリポフェクタミン添加量について更に詳細に検討した。すなわち、各ウェルに加えるプラスミド量(0.4μg)を固定し、リポフェクチンはウェル当り0.3~0.55μlの範囲で、リポフェクタミンはウェル当り0.4~0.9μlの範囲で添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図6に示した。リポフェクチンを0.35μl加えた場合、または、リポフェクタミンを0.6μl加えた場合にそれぞれ最も高いルシフェラーゼ活性を認めた。この結果を基に、リポフェクチンとリポフェクタミンの添加量をそれぞれ0.35μlと0.6μlに固定して、再度プラスミドの添加量を詳細に検討した。その結果を図7に示した。プラスミドを0.4~0.6μgを加えた場合に最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。以上の結果を基に、レポーター・アッセイにおける各ウェルに添加する最適なプラスミドの量を0.4μg~0.6μg、リポフェクチンの量を0.35μl、リポフェクタミンの量を0.6μlと決定した。

#### 【0018】実施例8(β-エストラジオールによる反応性の確認)

実施例6記載の方法および実施例7で得られた最適条件下に、HeLa細胞におけるβ-エストラジオール(E<sub>2</sub>)のエストロジエンレセプター活性化能を測定した。ウェル内のβ-エストラジオールの終濃度が10pMから50μMとなる条件でルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図8と9に示した。100pM以上でルシフェラーゼ活性の上昇を認め、1nMでの活性は最大に達した。β-エストラジオール50μMでは活性の低下が認められたがこれは細胞毒性によるものであると思われた。

#### 【0019】実施例9(化学物質のエストロジエン様作用の測定)

実施例6の方法および実施例7の結果で得られた最適条件下に、HeLa細胞におけるビスフェノールA、p-ノニルフェノール、酢酸トリプチルсуず、またはフタル酸ジ-2-エチルヘキシルのエストロジエンレセプター活性化能を測定した。アッセイにおける各被験化学物質の終濃度は10pMから50μMの範囲として実験を行った。各被験化学物質の溶解性を光学顕微鏡下、沈殿物あるいは浮遊物がないことを目視で確認した。また、被験化合物に替えてβ-エストラジオールを終濃度500pMとなるように添加した群を設定し、陽性対照とした。ビスフェノールAまたはノニルフェノールでは100nMで活性が上昇し

始め、 $10\mu M$ では活性化倍率は溶媒コントロール（DMSOのみ添加）の約5倍に上昇した（図10、11）。酢酸トリプチルすなはつタル酸ジーエチルヘキシルでは活性の上昇は認められなかった（図12、13）。さらに上記4種について $50\mu M$ での実験も行った。その結果を図14に示した。ビスフェノールAで更なる活性の上昇を認めた。ノニルフェノールにおいては細胞に対する毒性に起因すると思われる活性の低下が認められた。

## 【0020】参考例1（他の細胞用いたアッセイ）

他の種類の培養細胞を選び、実施例5～9と同様の実験を行う。

## 【0021】

【発明の効果】メダカエストロジエンレセプターをコードする遺伝子、および、化学物質の該レセプター活性化能を評価するための試験系等が提供可能となる。

## 【0022】

## 【配列表】

<110>; Sumitomo Chemical Company Limited

<120>; Estrogen receptor genes

<130>; P150237

<150>; JP 10/319465

<151>; 1998-11-10

<160>; 4

<210>; 1

<211>; 575

<212>; PRT

<213>; Oryzias latipes

<400>; 1

Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr

20	25	30
----	----	----

Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu

35	40	45
----	----	----

Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly

50	55	60
----	----	----

Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro

85	90	95
----	----	----

Val Tyr Arg Ser Ser Ile Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly

115	120	125
-----	-----	-----

Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys

130	135	140
-----	-----	-----

Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met

165	170	175
-----	-----	-----

Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly

180	185	190
-----	-----	-----

Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys  
 195 200 205  
 Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg  
 210 215 220  
 Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His  
 225 230 235 240  
 Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly  
 245 250 255  
 Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu  
 260 265 270  
 Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser  
 275 280 285  
 Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu  
 290 295 300  
 Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala  
 305 310 315 320  
 Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu  
 325 330 335  
 Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp  
 340 345 350  
 Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile  
 355 360 365  
 Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe  
 370 375 380  
 Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys  
 385 390 395 400  
 Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly  
 405 410 415  
 Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala  
 420 425 430  
 Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr  
 435 440 445  
 Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala  
 450 455 460  
 Gln Pro Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr  
 485 490 495  
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val  
 500 505 510  
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr  
 515 520 525  
 Ser Ser Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg  
 530 535 540  
 Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu  
 545 550 555 560  
 Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
 565 570 575

<:211>; 1728  
<:212>; DNA  
<:213>; Oryzias latipes

<:220>;  
<:221>; CDS  
<:222>; (1)...(1728)

&lt;:400&gt;; 2

aln lac cct gaa gag agc egg sgt tct gga ggg gtg get gct gtg gac	48
Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp	
1                      5                      10                      15	
cld llg gaa ggg aeg lac gac tat gcc gcc ccc aac cct gec aeg act	96
Leu Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr	
20                    25                      30	
ccc ctt lac aca cag tcc aca ggc tac tac tct gct ccc ctg gaa	144
Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu	
35                    40                      45	
aca aac gga ccc ccc lca gaa ggc agt ctg cag tcc ctg ggc agt ggg	192
Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly	
50                    55                      60	
cgg aeg aca cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc aca gca ctc aca ccc	240
Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro	
65                    70                      75                      80	
ttt atg cat cca ccc aca cac eac tat ctg gaa acc act tcc aca ccc	288
Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro	
85                    90                      95	
gtt lac aca tcc aca cac eac ggc gec tcc agg gag gac eac tgc ggc	336
Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly	
100                   105                      110	
tcc cgg gag aca tgc aca ctg ggg gag tta ggc gca gca ggg	384
Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly	
115                   120                      125	
get ggg ggg ttt gag atg gec aaa gac aca cgt ttc tgc gec gtg tgc	432
Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys	
130                   135                      140	
age gac lac gec tct ggg tac eac tat ggg gtg tgg tct tgt gag ggc	480
Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly	
145                   150                      155                      160	
tgc aag gec ttc ttc aag agg agc atc cag ggt eac aat gac tat atg	528
Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met	
165                   170                      175	
tgc cca gcg aca aat eac tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc	576
Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly	
180                   185                      190	
tgt cag get tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa	624
Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys	
195                   200                      205	
ggc ggt gtg cgc aag gac cgc att cgc att tta egg cgt gac aaa egg	672
Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg	

210	215	220	
cgg aca ggc gtt aat gat	gga gac aag gtt	gtt aat ggt cag gag cat	720
Arg Thr Gly Val Gly Asp	Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His		
225	230	235	240
aaa acg gtg cat tat gat	gga aat aat cgc acg acg aca	gga gga gga	768
Lys Thr Val His Tyr Asp	Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly		
245	250	255	
sga gga gga gga gga aga	ctg tct gtg acc acg ata	cct cct sag	816
Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu			
260	265	270	275
cag gtg ctg ctc ctc ctt	cag ggc gcc gag ccc	ccg ata ctc tgc tgc	864
Gln Val Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser			
280	285		
cgt cag aag ttg acg cga	ccg tac acc gag gtc acc ala	atg acc ctc	912
Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu			
290	295	300	
ctc acc acg atg gca gac	aag gag ctg gtc cac atg atc	gcc tgg gcc	960
Leu Thr Ser Met Ala Asp	Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala		
305	310	315	320
aag aag ctc cca ggt	tlt ctg cag ctg tcc	ctg cac gat cag gtg ctg	1008
Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu			
325	330	335	
ctg ctg gag acg tgc tgg	ctg gag gtg ctc atg atc	gcc ctc att tgg	1056
Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp			
340	345	350	
agg tcc atc cac tgt	ccc ggg aag ctc atc ttt	gca caa gac ctc atc	1104
Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile			
355	360	365	
ctg gac agg aat gag gga	gac tgc gtg gaa ggc	atg acg gag atc ttc	1152
Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe			
370	375	380	
gac atg ctg ctg gcc act	gtc tcc cgt gtg ctc aaa	ctc aaa ctc aaa	1200
Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys			
385	390	395	400
cct gag gaa ttc gtc tgc	ctc aaa get att att	tta ctc aac tcc ggt	1248
Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly			
405	410	415	
get ttt tct ttc tgc acc	ggc acc atg gag cca	ctt cac aac acg gcg	1296
Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala			
420	425	430	
gct gtt cag acg atg ctg	gac acc atc aca gac	gea ctc att cat tac	1344
Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr			
435	440	445	
atc agt cag tgc ggt	tac ttc gcc cag gag	cag gct aca ggg cag	1392
Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala			
450	455	460	
cag ccg ctc ctg ctg ctc	tcc cac atc agg cac	atc acg aac aaa ggc	1440
Gln Pro Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly			
465	470	475	480
atg gag cac ctc tac acg	atc aag aac aaa gtc	ctt tat	1488

Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr  
                  485                 490                 495  
 gac ctc cta ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc 1536  
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val  
                  500                 505                 510  
 aga gcc ccc cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc 1584  
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr  
                  515                 520                 525  
 agc agc ggc ggg ggt gga atc gct ccc ggt tct ata tca gca tct cga 1632  
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg  
                  530                 535                 540  
 ggc aga atc gag agt ccg aga ggc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt 1680  
 Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu  
                  545                 550                 555                 560  
 cag tat gga ggg tcc cgt cct gac tcc acc ccg gcc ctt caa gac tga 1728  
 Gln Tyr Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
                  565                 570                 575

<:210>; 3  
 <:211>; 620  
 <:212>; PRT  
 <:213>; Oryzias latipes

<:400>; 1  
 Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro  
     1             5                 10                 15  
 Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu  
     20             25                 30  
 Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro  
     35             40                 45  
 Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu  
     50             55                 60  
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr  
     65             70                 75                 80  
 Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly  
     85             90                 95  
 Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser  
     100            105                 110  
 Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His  
     115            120                 125  
 Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg  
     130            135                 140  
 Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu  
     145            150                 155                 160  
 Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly Gly  
     165            170                 175  
 Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr  
     180            185                 190  
 Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala  
     195            200                 205

Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala  
 210 215 220  
 Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val  
 245 250 255  
 Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly  
 260 265 270  
 Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val  
 275 280 285  
 His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly  
 290 295 300  
 Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser  
 340 345 350  
 Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu  
 355 360 365  
 Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu  
 370 375 380  
 Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile  
 385 390 395 400  
 His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg  
 405 410 415  
 Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu  
 420 425 430  
 Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu  
 435 440 445  
 Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser  
 450 455 460  
 Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln  
 465 470 475 480  
 Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln  
 485 490 495  
 Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Pro Leu  
 500 505 510  
 Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His  
 515 520 525  
 Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu  
 530 535 540  
 Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro  
 545 550 555 560  
 Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly  
 565 570 575  
 Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile  
 580 585 590  
 Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly  
 595 600 605

Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp

610 615

&lt;;210&gt;; 2

&lt;;211&gt;; 1863

&lt;;212&gt;; DNA

&lt;;213&gt;; Oryzias latipes

&lt;;220&gt;;

&lt;;221&gt;; CDS

&lt;;222&gt;; (1)...(1863)

&lt;;400&gt;; 2

atg agt aag aga cag agc tgg gtg cag atc agg cag ctg ttc gga cca  
Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro

1 5 10 15

gca ctc aga tcc agg atc aac cca gcc tcc tca gag ctg gag acc ctc  
Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu

20 25 30

tcc cca cct cgc ctc tgg ccc cgt gac ccc ctc ggt gac atg tac cct  
Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro

35 40 45

gaa gag aac cgg ggt tct gga ggg gtg gct gct gtg gac ctt ttg gaa  
Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu

50 55 60

ggg acg tac gac tat gcc gcc aac cct gcc acg act ccc ctt tac  
Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr

65 70 75 80

aac cag tcc aac acc ggc tac tac tct gct ccc ctg gaa aca aac gga  
Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly

85 90 95

ccc ccc tca gaa ggc aac ctg cag tcc ctg ggc aac ggc ccc aac aac  
Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser

100 105 110

cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc aac ccc aac ctc aac ccc ttt atg cat  
Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His

115 120 125

cca ccc aac cac eac tat ctg gaa acc aac act tcc aac ccc gtt tac aac  
Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg

130 135 140

tcc aac eac eac gga gac tcc agg gag gac cag tcc ggc tcc egg gag  
Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu

145 150 155 160

gac aac tcc aac ctc ggg gag tta ggc gca gca ggg gct ggg ggg  
Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly Gly

165 170 175

ttt gag atg gcc aaa gac aac ctc cgt ttc tcc gcc gtg tcc aac gac tac  
Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr

180 185 190

gcc tcc ggg tac eac tat ggg gtg tgg tct tgt gag ggc tcc aac gcc  
624

Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala  
 195 200 205 672  
 ttc ttc aag agg agc atc cag ggt cac aat gac tat atg tgc cca gcg  
 Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala  
 210 215 220 720  
 acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc tgc egt gct  
 Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala  
 225 230 235 240 768  
 tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gta gga atg atg aaa ggc ggt gtc  
 Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val  
 245 250 255 816  
 egc aag gac egc att cgc att tta cgg cgt gac aaa egg egg aca ggc  
 Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly  
 260 265 270 864  
 gtt ggt gat gga gac aag gtt gta aag ggt cag gag cat aaa acg gtc  
 Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val  
 275 280 285 912  
 eat tat gat gga agg aaa egc agc agc aca gga gga gga gga gga  
 His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly  
 290 295 300 960  
 gga gga gga aga ctg tct gtc acc agc ata cct cct gag cag stg ctg  
 Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu  
 305 310 315 320 1008  
 ctc ctc ctt cag ggc gcc gag ccc cgg ata ctc tgc tgc cgt egt cag aag  
 Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys  
 325 330 335 1056  
 ttg agc ega ccc tac acc gag gtc acc atg acc ctg ctc acc agc  
 Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser  
 340 345 350 1104  
 atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gec tgg gec aag aag ctc  
 Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu  
 355 360 365 1152  
 cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtc ctg ctg ctg gag  
 Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu  
 370 375 380 1200  
 age tgc tgg ctg gag gta ctc atg atc ggc ctc att tgg agg tcc atc  
 Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile  
 385 390 395 400 1248  
 cac tgt ccc ggg aag ctc atc ttt gca caa gac ctc atc ctg gac agg  
 His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg  
 405 410 415 1296  
 aat gag gga gac tgc stg gaa ggc atg acg gag atc ttc gac atg ctg  
 Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu  
 420 425 430 1344  
 ctg gec act get tcc ege ttc egt gtc ctc aaa ctc aaa cct gag gaa  
 Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu  
 435 440 445 1392  
 ttc gtc tgc ctc aaa gct att att tta ctc aac tcc ggt get ttt tct  
 Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser  
 450 455 460

ttc tgc acc ggc acc atg gag cca ctt cac aac age gcg gcg gtt cag	1440
Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln	
465 470 475 480	
age atg ctc gac acc atc aca gac gca ctc att cat tac atc agt cag	1488
Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln	
485 490 495	
tcc ggt tac ttg gcc cag gag cag gcg aga cgg cag gcc cag ccc ctc	1536
Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Pro Leu	
500 505 510	
ctg ctg ctc tcc cac atc agg cac atg age aac aaa ggc atg gag cac	1584
Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His	
515 520 525	
ctc tac agc atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ctc tat gac ctc cta	1632
Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu	
530 535 540	
ctg gag atg ctc gat gec cac cgc ctg cac cac ccc gtc aga gec ccc	1680
Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro	
545 550 555 560	
cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac ctc ccc tcc acc agc agc ggc	1728
Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly	
565 570 575	
ggg ggt gga atc get ccc ggt tct ata tca gca tct cga ggc aga atc	1776
Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile	
580 585 590	
gag agt ccg agc aga ggc ccc ttt get ccc agt gtc ctt cag tat gga	1824
Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phé Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly	
595 600 605	
ggg tcc cgt cct gac tgc acc ccc gec ctt caa gac tga	1863
Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp	
610 615 620	

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のエストロジエンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターの構築過程を示す図である。

【図2】本発明のエストロジエンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターRSV-ERの構造を示す図である。pRC/RSVは構築に用いたベクターである。ERは本発明のエストロジエン遺伝子を、RSV LTRはRSVプロモーターを、pSV40はSV40プロモーターを、Neomycinはネオマイシン耐性遺伝子をそれぞれ示す。

【図3】エストロジエン応答配列とレポーター遺伝子を含むレポータープラスミドERE-tK-pGL（図中ではERE-pGLと表示）の構築過程を示す図である。

【図4】エストロジエン応答配列とレポーター遺伝子を含むレポータープラスミドERE-tK-pGLの構造を示す図である。4XEREはエストロジエン応答配列が4個連結された配列を意味し、tK promoterはtKプロモーターを、Amp<sup>r</sup>アンピシリン耐性遺伝子を示す。

【図5】レポーター・アッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションの条件を検討した結果を示す図で

ある。上段の図は、トランスフェクション試薬にリボフェクチンを使用した場合、下段の図はリボフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図6】レポーター・アッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するトランスフェクション試薬の量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リボフェクチンを使用した場合、下段の図はリボフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図7】レポーター・アッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するプラスミドの量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リボフェクチンを使用した場合、下段の図はリボフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図8】レポーター・アッセイにおけるβ-エストラジオールのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25μgのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15μgのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1μgのコントロールレポータープラスミドpRL-tKを導入した細胞を試験に用いた。上段の図は、トランスフェクション試薬にリボフェクチ

ンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図9】レポーター・アッセイにおける $\beta$ -エストラジオールのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポーター・プラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポーター・プラスミドpRL-tKをリポフェクトアミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。

【図10】レポーター・アッセイにおけるビスフェノールAのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポーター・プラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポーター・プラスミドpRL-tKをリポフェクトアミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

【図11】レポーター・アッセイにおけるp-ノニルフェノールのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポーター・プラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポーター・プラスミドpRL-tKをリポフェクトアミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

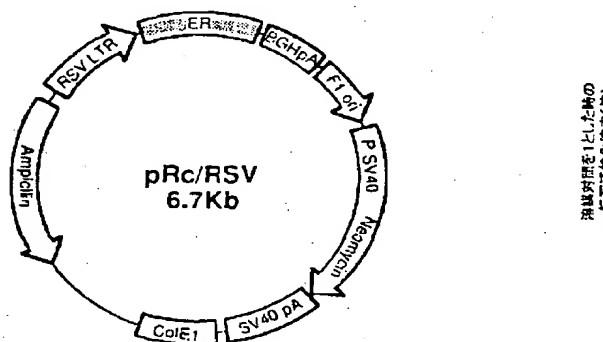
【図12】レポーター・アッセイにおける酢酸トリブチルすずのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポーター・プラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポーター・プラスミドpRL-tKをリポフェクトアミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。

E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

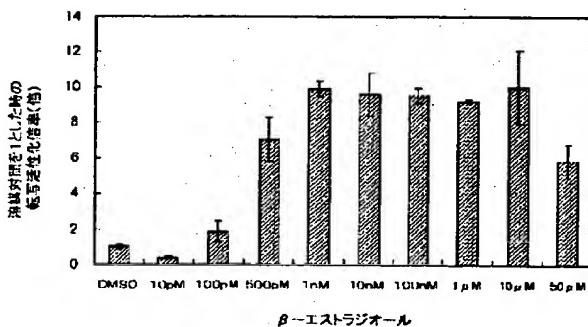
【図13】レポーター・アッセイにおけるフタル酸ジーエチルヘキシルのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポーター・プラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポーター・プラスミドpRL-tKをリポフェクトアミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

【図14】レポーター・アッセイにおける各種化合物のエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポーター・プラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポーター・プラスミドpRL-tKをリポフェクトアミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を、Tisは終濃度50 $\mu$ Mの酢酸トリブチルすずが添加された系を、BisAは終濃度50 $\mu$ MのビスフェノールAが添加された系を、Di-2は終濃度50 $\mu$ Mのフタル酸ジーエチルヘキシルが添加された系を、Nonylは終濃度50 $\mu$ Mのノニルフェノールが添加された系を示す。顕微鏡観察により判定された死亡細胞率は、酢酸トリブチルすずが添加された系において90%以上、ビスフェノールAが添加された系において0%、フタル酸ジーエチルヘキシルが添加された系において90%以上、ノニルフェノールが添加された系において40%前後であった。

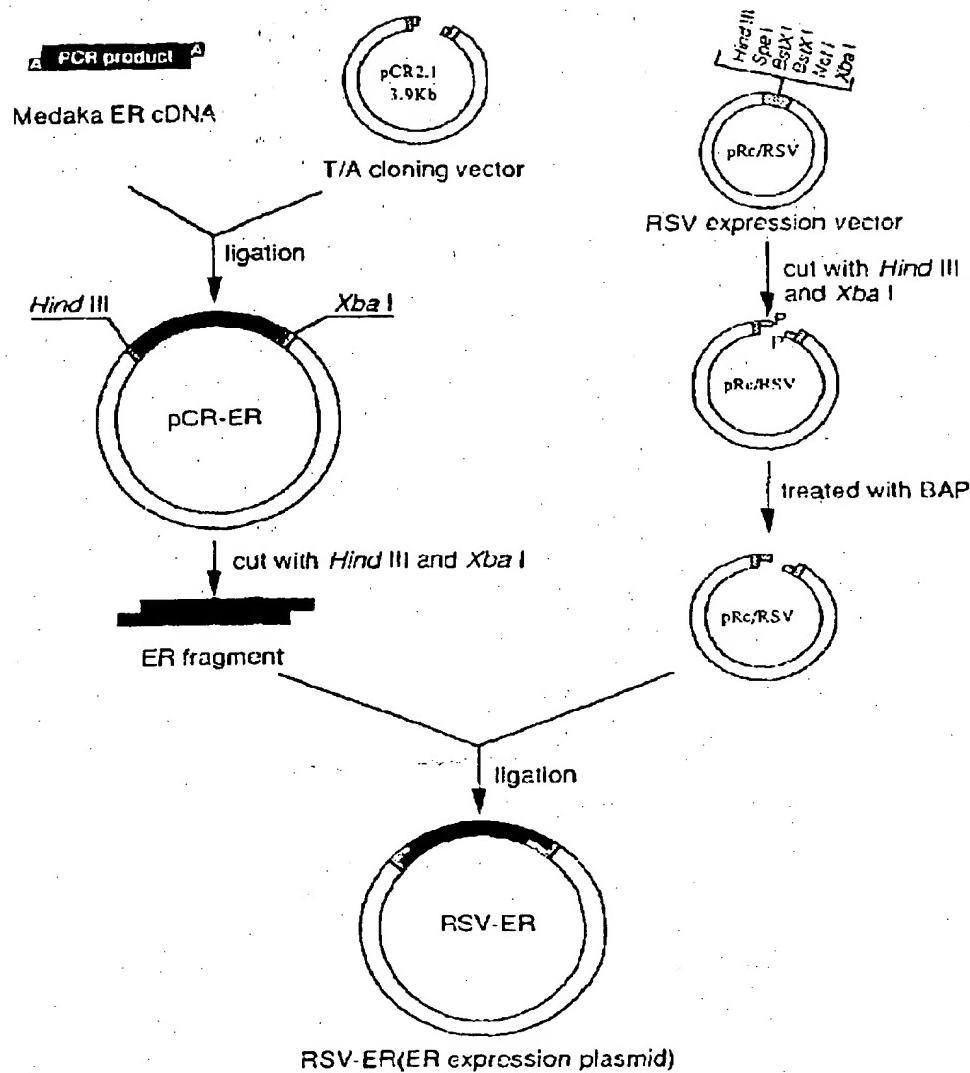
【図2】



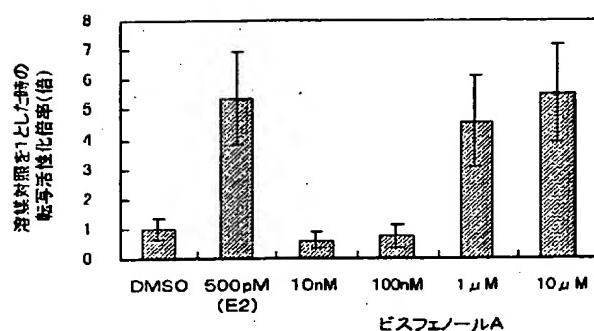
【図9】



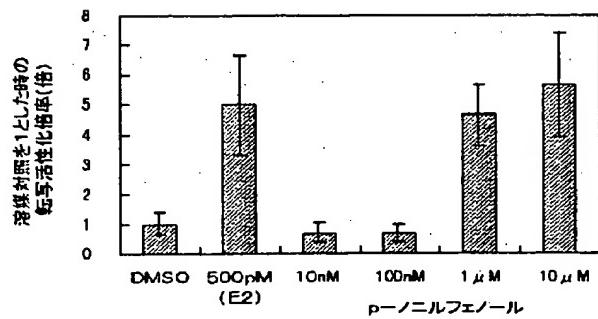
【図1】



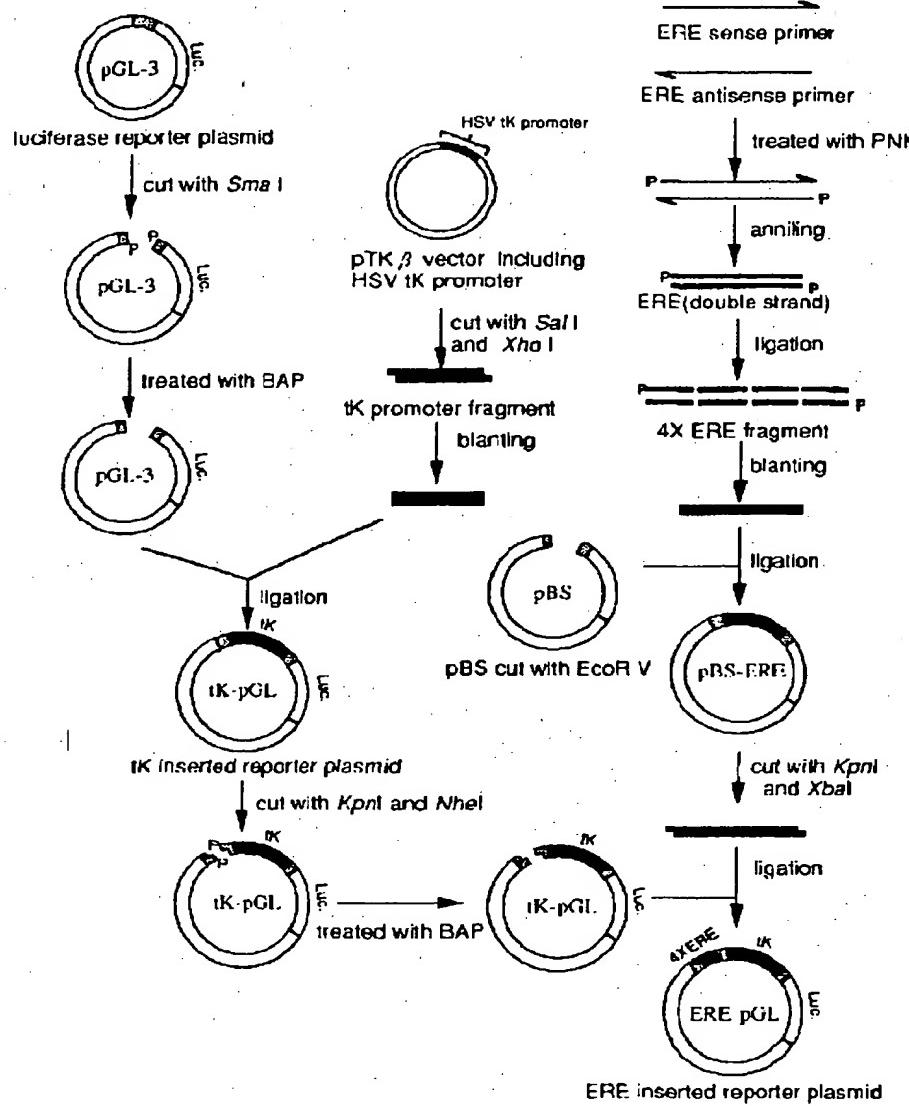
【図10】



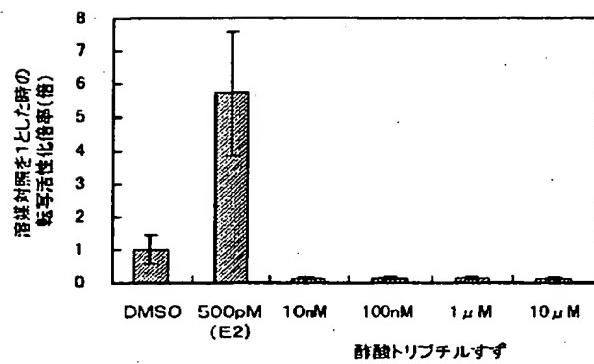
【図11】



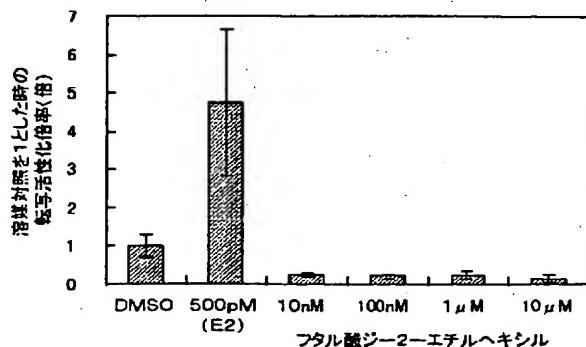
【図3】



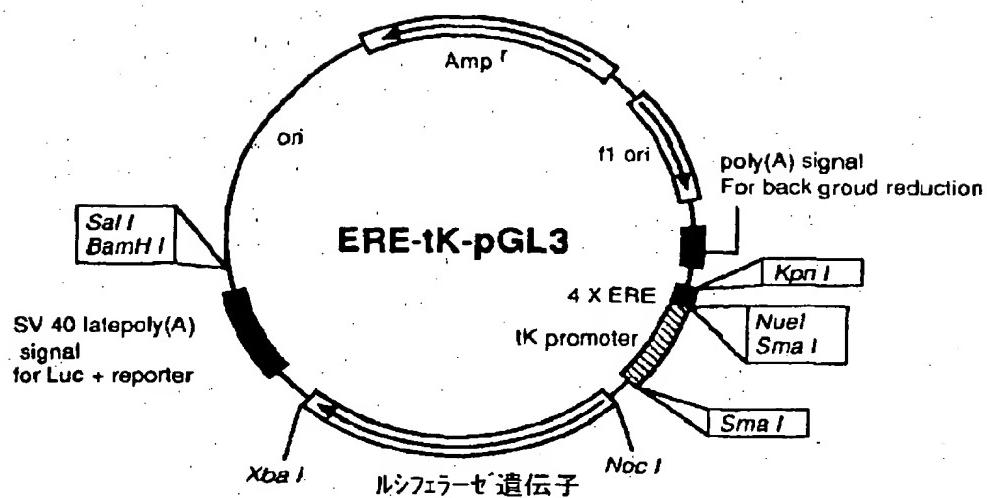
【図12】



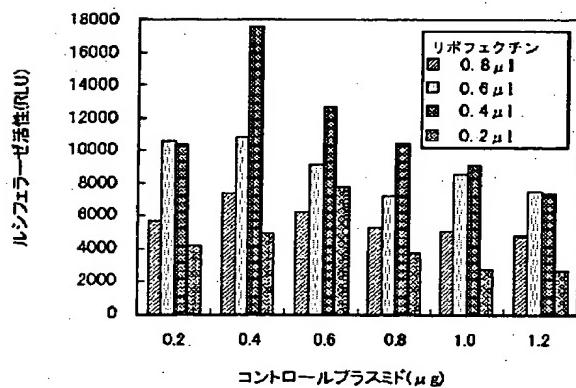
【図13】



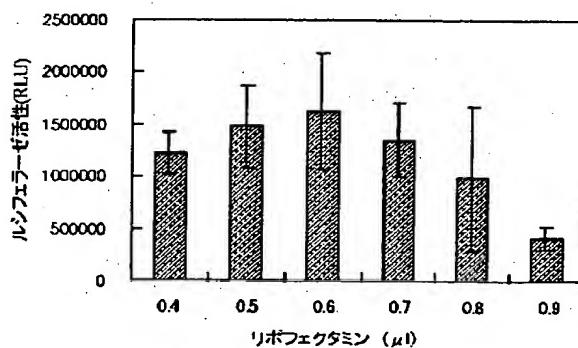
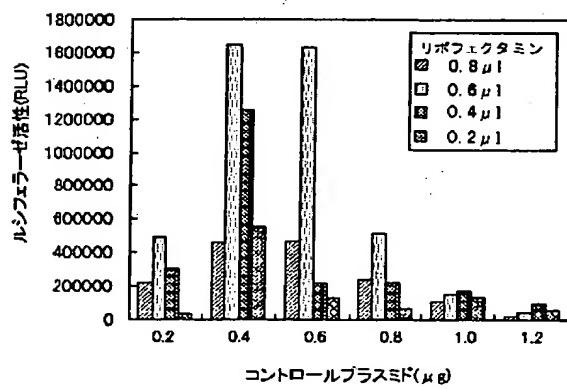
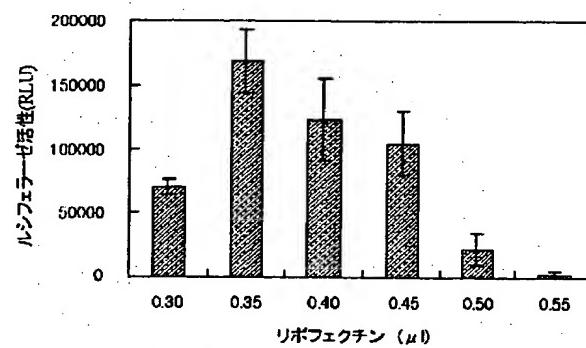
【図4】



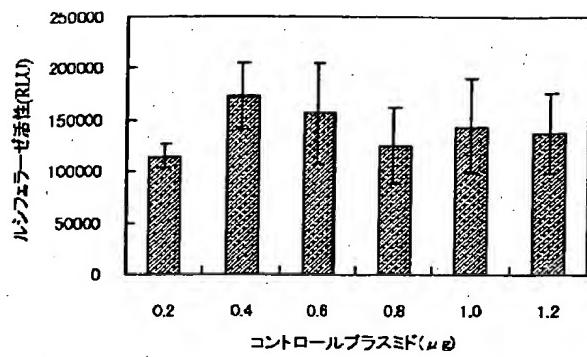
【図5】



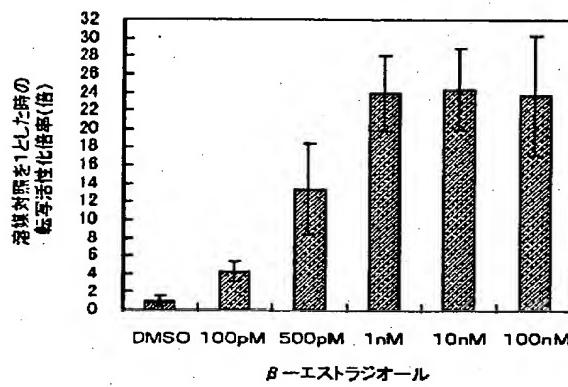
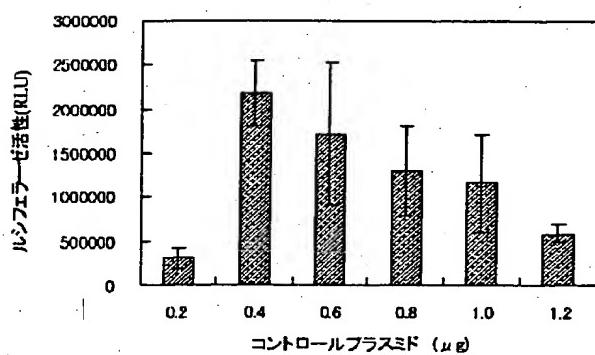
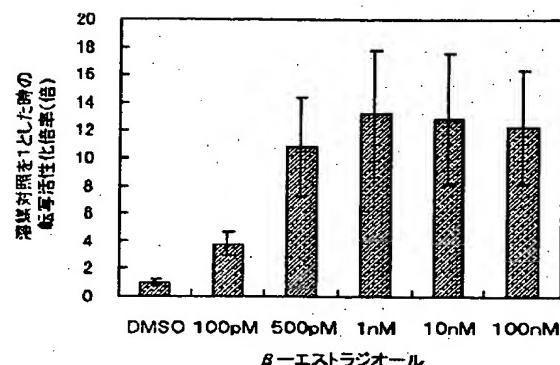
【図6】



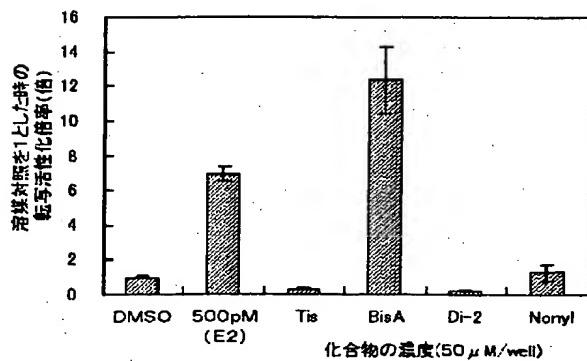
【図7】



【図8】



【図14】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7  
// (C 1 2 N 15/09  
C 1 2 R 1:91)  
(C 1 2 P 21/02  
C 1 2 R 1:91)

識別記号  
ZNA

F

マーク(参考)

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA17 AA20 BA63 DA02  
EA04 FA02 FA10 GA13 HA03  
HA11  
4B063 QA01 QQ22 QQ61 QQ75 QQ91  
QQ94 QR33 QR60 QR77 QR80  
QS36 QX02  
4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA13  
DA16  
4B065 AA90Y AA93X AB01 AC14  
BA05 CA46  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA52  
DA50 EA50 FA72 FA74 HA06

ID AAA92175 standard; DNA; 1863 BP.

P.D.05-09-2001

XX  
AC AAA92175; XP-002181483

P. 1-9- 9

XX  
DT 05-JAN-2001 (first entry)

XX  
DE Oryzias lapites oestrogen receptor encoding-DNA-SEQ-ID NO:4.

XX  
KW Oryzias lapites; oestrogen receptor ds.

XX  
OS Oryzias lapites.

XX  
PN JP2000201688-A.

XX  
PD 25-JUL-2000.

XX  
PF 06-APR-1999; 99JP-0098787.

XX  
PR 10-NOV-1998; 98JP-0319465.

XX  
PA (SUMO ) SUMITOMO CHEM CO LTD.

XX  
DR WPI; 2000-567950/53.

DR P-PSDB; AAB20898.

XX  
PT An estrogen receptor gene and its application

XX  
PS Claim 4; Page 15-17; 23pp; Japanese.

XX  
CC The present sequence encodes an oestrogen receptor derived from  
CC Oryzias lapites. Also described are: (1) a vector comprising the  
CC oestrogen receptor gene; (2) a transformant prepared by introducing  
CC the oestrogen receptor gene or vector from (1) into a host cell;  
CC (3) a method for the preparation of an oestrogen receptor comprising  
CC culturing the transformant from (2) to produce the oestrogen receptor;  
CC and (4) a method for the evaluation of oestrogen receptor-activating  
CC ability of a chemical substance in which the chemical substance is  
CC reacted with a transformant prepared by introducing a reporter gene  
CC connected downstream of a transcription controlling region containing  
CC an oestrogen response sequence and the above oestrogen receptor gene to  
CC an oestrogen-nonendogenous host cell. The transformant can be used for  
CC the evaluation of oestrogen receptor-activating ability of a chemical  
CC substance.

XX  
SQ Sequence 1863 BP; 406 A; 565 C; 531 G; 361 T; 0 other;  
atgagtaaga gacagagctc ggtgcagata aggcagctgt tcggaccaggc actcagatcc 60  
aggatcagcc cagcccttc agagctggag acacctcccc cacctcgccct ctcgccccgt 120  
gaccccccctcg .gigacatgtt ccctgaagag agccgggggtt ctggaggggtt ggctgctgtg 180  
gaccttttgg aagggacgtt cgaatatgcc gcccccaacc ctgccccac tcccccttac 240  
agccagtccca gcacccggctt ctaactctgtt cccctggaaa caaacggacc cccctcagaa 300  
ggcagtcgc agtccccctggg cagtggcccg acgagcccttc tgggttttgtt gcccctccagc 360  
cccagactca gtccttttat gcatccaccc agccaccact atctgaaac cacttccacg 420  
cccgtttaca gatccagccca ccaggggagcc tccaggggagg accagtgcgg ctcccccggag 480  
gacacgtgca gcctggggqa gtttagggccgc ggagccgggg ctgggggggtt tgagatggcc 540  
aaagacacgc gtttctgcgc cgtgtgcgc gactacgcct ctgggtacca ctatgggggt 600  
tggctttgtt aggctgcaa ggccttcttc aagaggagca tccagggtca caatgactat 660  
atgtgccccag cgaccaatca gtgcactatt gacagaaaatc gaagggaaagg ctgtcaggt 720  
tgtcgcttta ggaagtgtt cgaagtggga atgatgaaag gcggtgtgcg caaggacccgc 780  
attcgcattt tacggcgtga caaacggccgg acaggcggtt gtgatggaga caaggttgta 840  
aagggtcagg agcataaaac ggtgcattat gatggaaagg aacgcagcag cacaggagga 900  
ggaggaggag gaggaggagg aagactgtct gtgaccagca tacctcctga gcaggtgtg 960  
ctccctcccttc agggcgccga gcccccgata ctctgctcgc gtcagaagtt gagccgaccg 1020  
tacaccggagg tcaccatgtt gaccctgctc accagcatgg cagacaagga gctggtcac 1080  
atgatgcctt gggccaagaa gtcggccagg tttctgcagc tgtccctgca cgatcagggt 1140

ctgctgctgg agagctcgta gctggagggtg ctcatgatcg gcctcatttg gaggtccatc	1200
cactgtcccc ggaagctcat ctttgcacaa gacctcatcc tggacaggaa tgagggagac	1260
tgcgttggaaag gcatgacgga gatcttcgac atgctgctgg ccactgcttc ccgcttccgt	1320
tgctcaaac tcaaacctga ggaattcgta tgcctcaaag ctattatitt actcaactcc	1380
ggtgctttt ctttctgcac cggcaccatg gagccacttc acaacagcgc ggcggttcag	1440
agcatgctgg acaccatcac agacgcactc attcattaca tcagtcagtc gggttacttg	1500
gcccaggagc agggagacg gcaggccag ccgctctgc tgctctcca catcaggcac	1560
atgagcaaca aaggcatgga gcacacctac agcatgaagt gcaagaacaa agtccctctt	1620
tatgacctcc tactggagat gctcgatgcc caccgcctgc accacccgt cagagccccc	1680
cagtccttgt cccaaagtcta cagagacccct ccctccacca gcagccgggg gggtggaaatc	1740
gctcccggtt ctatatcagc atctcgaggg agaatacgaga gtccgagcag aggccccc	1800
gctcccagtg tccttcagta tggagggtcg cgctctgact gcaccccgcc cttcaagac	1860
tga.	1863

//

>>GSN:AAA92175 Oryzias lapites oestrogen receptor (1863 nt).  
initn: 9261 init1: 9261 opt: 9261 Z-score: 8922.0 bits: 1664.7 E(): 0  
99.678% identity (99.678% ungapped) in 1863 nt overlap (76-1938:1-1863)

50 60 70 80 90 100  
EP0111 CGTGGCGCAGCACATCTGAGGATGATTCACTGAGTAAGAGACAGAGCTCGGTGCAGATC  
:::  
GSN:AA ATGAGTAAGAGACAGAGCTCGGTGCAGATC  
10 20 30

110 120 130 140 150 160  
EP0111 AGGCAGCTGTTCGGACCAGCACTCAGATCCAGGATCAGGCCAGCCTCAGAGCTGGAG  
:::  
GSN:AA AGGCAGCTGTTCGGACCAGCACTCAGATCCAGGATCAGGCCAGCCTCAGAGCTGGAG  
40 50 60 70 80 90

170 180 190 200 210 220  
EP0111 ACCCTCTCCCCACCTCGCCCTCGCCCCGTGACCCCCCTCGGTGACATGTACCCCTGAAGAG  
:::  
GSN:AA ACCCTCTCCCCACCTCGCCCTCGCCCCGTGACCCCCCTCGGTGACATGTACCCCTGAAGAG  
100 110 120 130 140 150

230 240 250 260 270 280  
EP0111 AGCCGGGGTTCTGGAGGGGTGGCTGTGGACTTTTGGAAAGGGACGTACGACTATGCC  
:::  
GSN:AA AGCCGGGGTTCTGGAGGGGTGGCTGTGGACCTTTGGAAAGGGACGTACGACTATGCC  
160 170 180 190 200 210

290 300 310 320 330 340  
EP0111 GCCCCCAACCCTGCCACGACTCCCCTTACAGCCAGTCCAGCACCGGCTACTACTCTGCT  
:::  
GSN:AA GCCCCCAACCCTGCCACGACTCCCCTTACAGCCAGTCCAGCACCGGCTACTACTCTGCT  
220 230 240 250 260 270

350 360 370 380 390 400  
EP0111 CCCCTGGAAACAAACGGACCCCCCTCAGAAGGCAGTCAGTCAGTCCTGGCAGTGGCCG  
:::  
GSN:AA CCCCTGGAAACAAACGGACCCCCCTCAGAAGGCAGTCAGTCAGTCCTGGCAGTGGCCG  
280 290 300 310 320 330

410 420 430 440 450 460  
EP0111 ACGAGCCCTCTGGTGTGTTGTGCCCTCCAGCCCCAGACTCAGTCCTTATGCATCCACCC  
:::  
GSN:AA ACGAGCCCTCTGGTGTGTTGTGCCCTCCAGCCCCAGACTCAGTCCTTATGCATCCACCC  
340 350 360 370 380 390

470 480 490 500 510 520  
EP0111 AGCCACCACTATCTGGAAAACCACTTCCACGCCCGTTACAGATCCAGCCACCAGGGAGCC  
:::  
GSN:AA AGCCACCACTATCTGGAAAACCACTTCCACGCCCGTTACAGATCCAGCCACCAGGGAGCC  
400 410 420 430 440 450

530 540 550 560 570 580  
EP0111 TCCAGGGAGGACCACTGCGGCTCCGGAGGACACGTGCAGCCTGGGGAGTTAGGCC  
:::  
GSN:AA TCCAGGGAGGACCACTGCGGETCCGGAGGACACGTGCAGCCTGGGGAGTTAGGCC  
460 470 480 490 500 510

590 600 610 620 630 640  
EP0111 GGAGCCGGGGCTGGGGGTTGAGATGCCAAAGACACCGCTTCTGCGCCGTGCAGC  
:::  
GSN:AA GGAGCCGGGGCTGGGGGTTGAGATGCCAAAGACACCGCTTCTGCGCCGTGCAGC  
520 530 540 550 560 570

650 660 670 680 690 700

EP0111 GACTACGCCCTGGGTACCACTATGGGTGTTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA GACTACGCCCTGGGTACCACTATGGGTGTTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTC  
       580       590       600       610       620       630  
          710       720       730       740       750       760  
 EP0111 AAGAGGAGCATCCAGGGTACAATGACTATATGTGCCAGCGACCAATCAGTGCACATT  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA AAGAGGAGCATCCAGGGTACAATGACTATATGTGCCAGCGACCAATCAGTGCACATT  
       640       650       660       670       680       690  
          770       780       790       800       810       820  
 EP0111 GACAGAAAATCGGAGGAAGAGCTGCCAGGCTTGTCTTAGGAAGTGTACGAAGTGGGA  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA GACAGAAAATCGAAGGAAGGGCTGTCAAGGCTTGTCTTAGGAAGTGTACGAAGTGGGA  
       700       710       720       730       740       750  
          830       840       850       860       870       880  
 EP0111 ATGATGAAAGGCCTGTGCGCAAGGACCGCATTGCATTTACGGCTGACAAACGGCGG  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA ATGATGAAAGGCCTGTGCGCAAGGACCGCATTGCATTTACGGCTGACAAACGGCGG  
       760       770       780       790       800       810  
          890       900       910       920       930       940  
 EP0111 ACAGGCCTGGTGTGGAGACAAGGTTGAAAGGGTCAGGAGCATAAAACGGTGATTAT  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA ACAGGCCTGGTGTGGAGACAAGGTTGAAAGGGTCAGGAGCATAAAACGGTGATTAT  
       820       830       840       850       860       870  
          950       960       970       980       990       1000  
 EP0111 GATGGAAGGAAACGCAGCACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAAGACTGTCT  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA GATGGAAGGAAACGCAGCACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAAGACTGTCT  
       880       890       900       910       920       930  
          1010       1020       1030       1040       1050       1060  
 EP0111 GTGACCAGCATACCTCCTGAGCAGGTGCTGCTCCTCCTCAGGGCGCCGAGCCCCGATA  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA GTGACCAGCATACCTCCTGAGCAGGTGCTGCTCCTCCTCAGGGCGCCGAGCCCCGATA  
       940       950       960       970       980       990  
          1070       1080       1090       1100       1110       1120  
 EP0111 CTCTGCTCGCTCAGAACGTTGAGCCGACCGTACACCGAGGTACCATGATGACCTGCTC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA CTCTGCTCGCTCAGAACGTTGAGCCGACCGTACACCGAGGTACCATGATGACCTGCTC  
       1000       1010       1020       1030       1040       1050  
          1130       1140       1150       1160       1170       1180  
 EP0111 ACCAGCATGGCAGACAAGGAGCTGGTCCACATGATGCCCTGGGCCAAGAAGCTCCCAGGT  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA ACCAGCATGGCAGACAAGGAGCTGGTCCACATGATGCCCTGGGCCAAGAAGCTCCCAGGT  
       1060       1070       1080       1090       1100       1110  
          1190       1200       1210       1220       1230       1240  
 EP0111 TTTCTGCAGCTGTCCCTGCACGATCAGGTGCTGCTGGAGAGCTCGTGGCTGGAGGTG  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA TTTCTGCAGCTGTCCCTGCACGATCAGGTGCTGCTGGAGAGCTCGTGGCTGGAGGTG  
       1120       1130       1140       1150       1160       1170  
          1250       1260       1270       1280       1290       1300  
 EP0111 CTCATGATGGCCTCATTGGAGGTCCATCCACTGTCCCAGGAAAGCTCATCTTGACCAA  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA CTCATGATGGCCTCATTGGAGGTCCATCCACTGTCCCAGGAAAGCTCATCTTGACCAA  
       1180       1190       1200       1210       1220       1230

1310 1320 1330 1340 1350 1360  
 EP0111 GACCTCATCCTGGACAGGAATGAGGGAGACTGCGTGGAAAGGCATGACGGAGATCTCGAC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA GACCTCATCCTGGACAGGAATGAGGGAGACTGCGTGGAAAGGCATGACGGAGATCTCGAC  
 1240 1250 1260 1270 1280 1290  
  
 1370 1380 1390 1400 1410 1420  
 EP0111 ATGCTGCTGGCCACTGCTTCCCCTCGTGCTCAAACCTCAAACCTGAGGAATTGTC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA ATGCTGCTGGCCACTGCTTCCCCTCGTGCTCAAACCTCAAACCTGAGGAATTGTC  
 1300 1310 1320 1330 1340 1350  
  
 1430 1440 1450 1460 1470 1480  
 EP0111 TGCCTCAAAGCTATTATTTACTCAACTCCGGTGCTTTCTGCACCGGCACCATG  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA TGCCTCAAAGCTATTATTTACTCAACTCCGGTGCTTTCTGCACCGGCACCATG  
 1360 1370 1380 1390 1400 1410  
  
 1490 1500 1510 1520 1530 1540  
 EP0111 GAGCCACTTCACAACAGCGCGGGTTCAGAGCATGCTGGACACCATCACAGACGCACTC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA GAGCCACTTCACAACAGCGCGGGGGTTCAGAGCATGCTGGACACCATCACAGACGCACTC  
 1420 1430 1440 1450 1460 1470  
  
 1550 1560 1570 1580 1590 1600  
 EP0111 ATTCAATTACATCAGTCAGTCGGGTTACTTGGCCCAGGAGCAGGCGAGACGGCAGGCCAG  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA ATTCAATTACATCAGTCAGTCGGGTTACTTGGCCCAGGAGCAGGCGAGACGGCAGGCCAG  
 1480 1490 1500 1510 1520 1530  
  
 1610 1620 1630 1640 1650 1660  
 EP0111 CTGCTCCTGCTCTCCCACATCAGGCACATGAGCAACAAAGGCATGGAGCACCTCTAC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA CCGCTCCTGCTCTCCCACATCAGGCACATGAGCAACAAAGGCATGGAGCACCTCTAC  
 1540 1550 1560 1570 1580 1590  
  
 1670 1680 1690 1700 1710 1720  
 EP0111 AGCATGAAGTGCAGAACAAAGTCCCTCTTATGACCTCCTACTGGAGATGCTCGATGCC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA AGCATGAAGTGCAGAACAAAGTCCCTCTTATGACCTCCTACTGGAGATGCTCGATGCC  
 1600 1610 1620 1630 1640 1650  
  
 1730 1740 1750 1760 1770 1780  
 EP0111 CACCGCCTGCACCACCCCGTCAGAGCACCCAGTCCTGTCCCAGTCGACAGAGACCT  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA CACCGCCTGCACCACCCCGTCAGAGCCCCAGTCCTGTCCCAGTCGACAGAGACCT  
 1660 1670 1680 1690 1700 1710  
  
 1790 1800 1810 1820 1830 1840  
 EP0111 CCCTCCACCAGCAGCGCGGGGGTGGAAATCGCTCCGGTTCTATATCAGCATCTCGAGGC  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA CCCTCCACCAGCAGCGCGGGGGTGGAAATCGCTCCGGTTCTATATCAGCATCTCGAGGC  
 1720 1730 1740 1750 1760 1770  
  
 1850 1860 1870 1880 1890 1900  
 EP0111 AGAATCGAGAGTCCGAGCAGAGGGCCCTTGCTCCAGTGTCTCAGTATGGAGGGTCG  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA AGAATCGAGAGTCCGAGCAGAGGGCCCTTGCTCCAGTGTCTCAGTATGGAGGGTCG  
 1780 1790 1800 1810 1820 1830  
  
 1910 1920 1930 1940 1950 1960  
 EP0111 CGTCCTGACTGCACCCCGGCCCTCAAGACTGAGCACACAGTCCAAGGCCCTTTTGT  
 :::::::::::::::::::::  
 GSN:AA CGTCCTGACTGCACCCCGGCCCTCAAGACTG  
 1840 1850 1860

1970 1980 1990 2000 2010 2020  
EP0111 GGCTCAAGGGTTCAGGTTGGGACAAGGTGATGCTTGATTTAATTAAAGAATTATTTATA

ID AAB20898 standard; Protein; 620 AA.  
XX  
AC AAB20898;  
XX  
DT 05-JAN-2001 (first entry)  
XX  
DE Oryzias lapites oestrogen receptor protein SEQ ID NO:3.  
XX  
KW Oryzias lapites; oestrogen receptor.  
XX  
OS Oryzias lapites.  
XX  
PN JP2000201688-A.  
XX  
PD 25-JUL-2000.  
XX  
PF 06-APR-1999; 99JP-0098787.  
XX  
PR 10-NOV-1998; 98JP-0319465.  
XX  
PA (SUMO ) SUMITOMO CHEM CO LTD.  
XX  
DR WPI; 2000-567950/53.  
DR N-PSDB; AAA92175.  
XX  
PT An estrogen receptor gene and its application  
XX  
PS Claim 2; Page 13-15; 23pp; Japanese.  
XX  
CC The present sequence represents an oestrogen receptor of  
CC Oryzias lapites. Also described are: (1) a vector comprising  
CC an oestrogen receptor gene; (2) a transformant prepared by  
CC introducing the oestrogen receptor gene or vector from (1) into a host  
CC cell; (3) a method for the preparation of an oestrogen receptor  
CC by culturing the transformant from (2) to produce the oestrogen  
CC receptor; and (4) a method for the evaluation of oestrogen receptor  
CC ability of a chemical substance in which the chemical substance  
CC is reacted with a transformant prepared by introducing a  
CC sequence connected downstream of a transcription controlling region  
CC which contains an oestrogen response sequence and the above oestrogen  
CC receptor into an oestrogen-nonendogenous host cell. The transformant  
CC can be used for the evaluation of oestrogen receptor-activating ability  
CC of the substance.  
XX  
SQ Sequence 620 AA:  
SQ 39 A; 44 R; 10 N; 29 D; 0 B; 18 C; 27 Q; 31 E; 0 Z;  
SQ 24 I; 67 L; 25 K; 20 M; 15 F; 43 P; 67 S; 30 T; 4 W;  
SQ 0 Others;  
mskrqssvqi rqlfgpalrs rispassele tlsprrlspr dplgdmypee  
dllegtydya apnpattply sqsstgysa pletngppse gslqslqsgp  
prlspfmhpp shhylettst pvyrsshqga sredqcsre dtcslgelga  
kdtrfcavcs dyasgyhygv wsccegckaff krsiqghndy mcpatnacti  
crlrkcyevg mmkggvrkdr irilrrdkrr tvgvdgdkvv kgqehktvh  
gggggggrls vtsippeqvl lllogeoppo leorqhlarp ytevtmtll  
miawakklpg flqlslhdqv lllesswlev lmigliwrsi hcpgklifq  
cvegmteifd mllatasrfr viklkpeefv cikaiiilns gefsfctgtm  
smldtitdal ihyisqsgyl aqeqarrqaq plllshirh msnkgmehly  
ydllemlda brlhhpvrap qslsqvdrdp pstssgggi apgsisasrg  
apsvlayqqs rpdctpalqd

11

1 of 1

25-10-2001 15

>>GSP:AAB20898 Oryzias lapites oestrogen receptor (620 aa)  
initn: 4198 init1: 4198 opt: 4198 z-score: 3093.7 bits: 584.7 E(): 2.3e-164  
Smith-Waterman score: 4198, 99.516% identity (99.516% ungapped) in 620 aa overlap  
(75-1934:1-620)

90	120	150	180	210	240
EP0111 MSKRQSSVQIRQLFGPALRSRISPASSELETLSPPKLSPRDPLGDMYPEESRGSGGVAAV ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA MSKRQSSVQIRQLFGPALRSRISPASSELETLSPPKLSPRDPLGDMYPEESRGSGGVAAV 10 20 30 40 50 60					
270	300	330	360	390	420
EP0111 DFLEGTYDYAAPNPATTPLYSQSSTGYYSALENGPPSEGSLQSLGSGPTSPLVFVPSS ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA DLLEGTYDYAAPNPATTPLYSQSSTGYYSALENGPPSEGSLQSLGSGPTSPLVFVPSS 70 80 90 100 110 120					
450	480	510	540	570	600
EP0111 PRLSPFMHPPSHYLETSTPVYRSSHQGASREDQCGSREDTCSLGEKGAGAGAGGFEMA ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA PRLSPFMHPPSHYLETSTPVYRSSHQGASREDQCGSREDTCSLGEKGAGAGAGGFEMA 130 140 150 160 170 180					
630	660	690	720	750	780
EP0111 KDTRFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPATNQCTIDRNRRKSCQA ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA KDTRFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPATNQCTIDRNRRKSCQA 190 200 210 220 230 240					
810	840	870	900	930	960
EP0111 CRLRKCYEVGMMKGGVRKDRIRILRRDKRTGVGDGVVKVGQEHKTVHYDGRKRSSTGG ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA CRLRKCYEVGMMKGGVRKDRIRILRRDKRTGVGDGVVKVGQEHKTVHYDGRKRSSTGG 250 260 270 280 290 300					
990	1020	1050	1080	1110	1140
EP0111 GGGGGGRLSVTSIPPEQVLLLLQGAEPPILCSRQKLSRPYEVIMMTLLTSMADKELVH ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA GGGGGGRLSVTSIPPEQVLLLLQGAEPPILCSRQKLSRPYEVIMMTLLTSMADKELVH 310 320 330 340 350 360					
1170	1200	1230	1260	1290	1320
EP0111 MIAWAKKLPGFLQLSLHDQVLLLESSWLEVLMIGLIWRSIHC PGKLIFAQDLILDRNEGD ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA MIAWAKKLPGFLQLSLHDQVLLLESSWLEVLMIGLIWRSIHC PGKLIFAQDLILDRNEGD 370 380 390 400 410 420					
1350	1380	1410	1440	1470	1500
EP0111 CVEGMTEIFDMLLATASRFRVLKLPEEFVCLKAIILLNSGAFSFTGTMEPLHNSAAVQ ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA CVEGMTEIFDMLLATASRFRVLKLPEEFVCLKAIILLNSGAFSFTGTMEPLHNSAAVQ 430 440 450 460 470 480					
1530	1560	1590	1620	1650	1680
EP0111 SMLDTITDALIHYISQSGYLAQEQRRAQPLLLLSHIRHMSNKGMELYSMKCKNKVPL ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA SMLDTITDALIHYISQSGYLAQEQRRAQPLLLLSHIRHMSNKGMELYSMKCKNKVPL 490 500 510 520 530 540					
1710	1740	1770	1800	1830	1860
EP0111 YDLLLEMLDAHRLHHPVRAPQSLSQVDRDPSTSSGGGIAPGSISASRGRIESPSRGPF ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::					
GSP:AA YDLLLEMLDAHRLHHPVRAPQSLSQVDRDPSTSSGGGIAPGSISASRGRIESPSRGPF 550 560 570 580 590 600					

1890 1920  
EP0111 APSVLQYGGSRPDCTPALQD  
::::::: :::::::  
GSP:AA APSVLQYGGSRPDCTPALQD  
610 620

ID AAA92174 standard; DNA; 1728 BP.

XX  
AC AAA92174; **XP-002181484**

XX  
DT 05-JAN-2001 (first entry)

DE Oryzias lapites oestrogen receptor encoding DNA SEQ ID NO:2.

XX  
KW Oryzias lapites; oestrogen receptor; ds.

XX  
OS Oryzias lapites.

XX  
PN JP2000201688-A.

XX  
PD 25-JUL-2000.

XX  
PF 06-APR-1999; 99JP-0098787.

XX  
PR 10-NOV-1998; 98JP-0319465.

XX  
PA (SUMO) SUMITOMO CHEM CO LTD.

XX  
DR WPI; 2000-567950/53.

DR P-PSDB; AAB20897.

XX  
PT An estrogen receptor gene and its application

XX  
PS Claim 3; Page 11-13; 23pp; Japanese.

XX  
CC The present sequence encodes an oestrogen receptor derived from  
CC Oryzias lapites. Also described are: (1) a vector comprising the  
CC oestrogen receptor gene; (2) a transformant prepared by introducing  
CC the oestrogen receptor gene or vector from (1) into a host cell;  
CC (3) a method for the preparation of an oestrogen receptor comprising  
CC culturing the transformant from (2) to produce the oestrogen receptor;  
CC and (4) a method for the evaluation of oestrogen receptor-activating  
CC ability of a chemical substance in which the chemical substance is  
CC reacted with a transformant prepared by introducing a reporter gene  
CC connected downstream of a transcription controlling region containing  
CC an oestrogen response sequence and the above oestrogen receptor gene to  
CC an oestrogen-nonendogenous host cell. The transformant can be used for  
CC the evaluation of oestrogen receptor-activating ability of a chemical  
CC substance.

XX  
SQ Sequence 1728 BP; 378 A; 514 C; 497 G; 339 T; 0 other;

atgtaccctg	aagagagccg	gggttctgga	gggggtggctg	ctgtggacct	tttggaaagg	60
acgtacgact	atgccgc	cccccaaccctg	ccacactcccc	tttacagcca	gtccagcacc	120
ggctactact	ctgtccc	ctt	ggaaacaaaac	ggacccccc	cagaaggcag	180
ctgggcagt	ggccgacgag	ccctctgg	tttgtgc	ccagccccc	actcagtccc	240
tttatgcac	cacc	cacca	tctg	gaaaccactt	ccacgccc	300
agccaccagg	gagg	ccagg	tgccg	ctccc	ttacagatcc	360
ggggagttag	gcgc	ccgg	ggc	ggagg	gtgcagc	420
tgccgcgtgt	gcag	gcacta	cgc	cc	cttc	480
tgcaaggcct	tctt	caagag	gagcat	ccat	ccat	540
aatcagt	atcg	aaatcg	atcg	atcg	atcg	600
tgttac	cgaa	ttgtt	ggatgt	ggatgt	ttttac	660
cgtgaca	aaac	ggcc	ggcc	ggcc	tttac	720
aaaacgg	ttat	atcg	atcg	atcg	atcg	780
ggagga	ggac	ggat	ggat	ggat	ggat	840
gccgag	cc	cc	cc	cc	cc	900
atgat	tgct	tgct	tgct	tgct	tgct	960
aagaag	ctcc	catt	tttct	tttct	tttct	1020
tcgtgg	tttct	tttct	tttct	tttct	tttct	1080
ctcat	tttct	tttct	tttct	tttct	tttct	1140

RE 05-01-2001  
P. 1-7 7

acggagatct tcgacatgct gctggccact gttcccgt tccgtgtgct ccaaactcaaa 1200  
cctgaggaat tcgtctgcct caaagctatt attttactca actccgggtc tttttctttc 1260  
tgcaccggca ccatggagcc acttcacaac agcgccgggg tttagagcat gctggacacc 1320.  
atcacagacg cactcattca ttacatcagt cagtcgggtt acttggccca ggagcaggcg 1380  
agacggcagg cccagccgct cctgctgctc tccccacatca ggcacatgag caacaaaggc 1440  
atggagcacc tctacagcat gaagtgcagaag aacaaagtcc ctctttatga cctcctactg 1500  
gagatgcctcg atgeccaccg cctgcaccac cccgtcagag ccccccagtc ctgtcccaa 1560.  
gtcgacagag accctccctc caccagcagc ggcgggggtg gaatgcctcc cggttctata 1620  
tcagcatctc gaggcagaat cgagatccg agcagaggcc ccttgcctcc cagtgccctt 1680  
cagtatggag ggtcgctcc tgactgcacc ccggcccttc aagactga 1728

>>GSN:AAA92174 Oryzias lapites oestrogen receptor (1728 nt)  
initn: 8586 initl: 8586 opt: 8586 z-score: 8271.0 bits: 1544.2 E(): 0  
99.653% identity (99.653% ungapped) in 1728 nt overlap (211-1938:1-1728)

190	200	210	220	230	240		
EP0111 CGCCTCTGCCCGTGACCCCTGGTACATGTACCCGAAGAGAGCCGGGTTCTGGA	ATGTACCCGAAGAGAGCCGGGTTCTGGA	10	20	30			
250	260	270	280	290	300		
EP0111 GGGGTGGCTGCTGTGGACTTTTGGAAAGGGACGTACGACTATGCCGCCCCAACCTGCC	GGGGTGGCTGCTGTGGACCTTTGGAAAGGGACGTACGACTATGCCGCCCCAACCTGCC	40	50	60	70	80	90
310	320	330	340	350	360		
EP0111 ACGACTCCCCTTACAGCCAGTCCAGCACCGGCTACTACTCTGCCTCCCTGGAAACAAAC	ACGACTCCCCTTACAGCCAGTCCAGCACCGGCTACTACTCTGCCTCCCTGGAAACAAAC	100	110	120	130	140	150
370	380	390	400	410	420		
EP0111 GGACCCCCCTCAGAAGGCAGTCTGCAGTCCCTGGGAGTGGCCGACGAGCCCTCTGGTG	GGACCCCCCTCAGAAGGCAGTCTGCAGTCCCTGGGAGTGGCCGACGAGCCCTCTGGTG	160	170	180	190	200	210
430	440	450	460	470	480		
EP0111 TTTGTGCCCTCCAGCCCCAGACTCAGTCCCTTATGCATCCACCCAGCCACCACTATCTG	TTTGTGCCCTCCAGCCCCAGACTCAGTCCCTTATGCATCCACCCAGCCACCACTATCTG	220	230	240	250	260	270
490	500	510	520	530	540		
EP0111 GAAACCACTTCCACGCCGTTTACAGATCCAGCCACCAGGAGCCTCCAGGGAGGAGCAG	GAAACCACTTCCACGCCGTTTACAGATCCAGCCACCAGGAGCCTCCAGGGAGGAGCAG	280	290	300	310	320	330
550	560	570	580	590	600		
EP0111 TGCGGCTCCGGGAGGAACGTGCAGCCTGGGGAGTTAGGCAGCCGGAGCCGGGCTGGG	TGCGGCTCCGGGAGGAACGTGCAGCCTGGGGAGTTAGGCAGCCGGAGCCGGGCTGGG	340	350	360	370	380	390
610	620	630	640	650	660		
EP0111 GGGTTGAGATGGCAAAGACACGCCGTTCTGCAGCCGTGTGCAGCGACTACGCCCTCTGGG	GGGTTGAGATGGCAAAGACACGCCGTTCTGCAGCCGTGTGCAGCGACTACGCCCTCTGGG	400	410	420	430	440	450
670	680	690	700	710	720		
EP0111 TACCACTATGGGTGTGGTCTTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTAAGAGGAGCATCCAG	TACCACTATGGGTGTGGTCTTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTAAGAGGAGCATCCAG	460	470	480	490	500	510
730	740	750	760	770	780		
EP0111 GGTACAATGACTATATGTGCCAGCGACCAATCAGTGCAGTATTGACAGAAATCGGAGG	GGTACAATGACTATATGTGCCAGCGACCAATCAGTGCAGTATTGACAGAAATCGAAGG	520	530	540	550	560	570



1450	1460	1470	1480	1490	1500
EP0111 ATTTTACTCAACTCCGGTGCCTTCTTCTGCACCGGACCATGGAGCCACTTCACAAAC ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA ATTTTACTCAACTCCGGTGCCTTCTTCTGCACCGGACCATGGAGCCACTTCACAAAC 1240      1250      1260      1270      1280      1290					
1510	1520	1530	1540	1550	1560
EP0111 AGCGCGGCCGGTTCAGAGGATGGCAGACCCATCACAGACGGACTCAATTACATCACT ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA AGCGCGGCCGGTTCAGAGCAGTGCTGGACACCATCACAGACGCACTCAATTACATCACT 1300      1310      1320      1330      1340      1350					
1570	1580	1590	1600	1610	1620
EP0111 CAGTCGGGTTACTTGGCCCAGGAGCAGGCAGACGGCAGGCCAGCTGCTCCTGCTGCTGCT ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA CAGTCGGGTTACTTGGCCCAGGAGCAGGCAGACGGCAGGCCAGCCGCTCCTGCTGCTC 1360      1370      1380      1390      1400      1410					
1630	1640	1650	1660	1670	1680
EP0111 TCCCACATCAGGCACATGAGCAAACAAAGGATGGACCCACCTCTACACCATGAAGTCCAAAC ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA TCCCACATCAGGCACATGAGCAAACAAAGGATGGACCCACCTCTACACCATGAAGTCCAAAC 1420      1430      1440      1450      1460      1470					
1690	1700	1710	1720	1730	1740
EP0111 AACAAAGTCCCTCTTATGACCTCCTACTGGAGATGCTCGATGCCAACGCCCTGCTGCAACAC ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA AACAAAGTCCCTCTTATGACCTCCTACTGGAGATGCTCGATGCCAACGCCCTGCTGCAACAC 1480      1490      1500      1510      1520      1530					
1750	1760	1770	1780	1790	1800
EP0111 CCCGTCAGAGCACCCCCAGTCCTTGTCCAACTGGAGACAGACCCCTCCCTCACCAGGAG ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA CCCGTCAGAGCCCCCAGTCCTTGTCCAACTGGAGACAGAGACCCCTCCCTCACCAGGAG 1540      1550      1560      1570      1580      1590					
1810	1820	1830	1840	1850	1860
EP0111 GGCGGGGGTGBAATCGCTCCCGGTPCTATATCAGCATCTCGAGGGAGAAATCGAGACTCGG ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA GGCGGGGGTGBAATCGCTCCCGGTTCTATATCAGCATCTCGAGGGAGAAATCGAGACTCG 1600      1610      1620      1630      1640      1650					
1870	1880	1890	1900	1910	1920
EP0111 AGCAGAGGCCCTTGTCCCAGTGTCTTCAGTATGGAGGGTGCCTGACTGCACC ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA AGCAGAGGCCCTTGTCCCAGTGTCTTCAGTATGGAGGGTGCCTGACTGCACC 1660      1670      1680      1690      1700      1710					
1930	1940	1950	1960	1970	1980
EP0111 CCGGCCCTTCAAGACTGAGCACACAGTCCAAGGCCCTTTTGTGGCTAAGGGTTCAG ::::::::::: :::::::::::					
GSN:AA CCGGCCCTTCAAGACTGA 1720					

1Y

ID AAB20897 standard; Protein; 575 AA.  
XX  
AC AAB20897;  
XX  
DT 05-JAN-2001 (first entry)  
XX  
DE Oryzias lapites oestrogen receptor protein SEQ ID NO:1.  
XX  
KW Oryzias lapites; oestrogen receptor.  
XX  
OS Oryzias lapites.  
XX  
PN JP2000201688-A.  
XX  
PD 25-JUL-2000.  
XX  
PF 06-APR-1999; 99JP-0098787.  
XX  
PR 10-NOV-1998; 98JP-0319465.  
XX  
PA (SUMO ) SUMITOMO CHEM CO LTD.  
XX  
DR WPI; 2000-567950/53.  
DR N-PSDB; AAA92174.  
XX  
PT An estrogen receptor gene and its application  
XX  
PS Claim 1; Page 9-10; 23pp; Japanese.  
XX  
CC The present sequence represents an oestrogen receptor derived from  
CC Oryzias lapites. Also described are: (1) a vector comprising the  
CC oestrogen receptor gene; (2) a transformant prepared by introducing  
CC the oestrogen receptor gene or vector from (1) into a host cell;  
CC (3) a method for the preparation of an oestrogen receptor comprising  
CC culturing the transformant from (2) to produce the oestrogen receptor;  
CC and (4) a method for the evaluation of oestrogen receptor-activating  
CC ability of a chemical substance in which the chemical substance is  
CC reacted with a transformant prepared by introducing a reporter gene  
CC connected downstream of a transcription controlling region containing  
CC an oestrogen response sequence and the above oestrogen receptor gene to  
CC an oestrogen-nonendogenous host cell. The transformant can be used for  
CC the evaluation of oestrogen receptor-activating ability of a chemical  
CC substance.  
XX  
SQ Sequence.. 575 AA;  
SQ 37 A; 38 R; 10 N; 27 D; 0 B; 18 C; 24 Q; 29 E; 0 Z; 58 G; 19 H;  
SQ 22 I; 61 L; 24 K; 19 M; 14 F; 37 P; 58 S; 29 T; 4 W; 20 Y; 27 V;  
SQ 0 Others;  
SQ mypeesrgsg gvaavdlleg tydyaapnpa ttplysqsst gyysapletn gppsegslqs  
lqsgptspfv fpssprlsp fmhppshyl ettstpyyrs shgasredq cgsredtcs  
gelgagagag gfemakdtrf cavcsdyasg yhygvwsceg ckaffkrsiq ghndymcpat  
nqctidrnrr kgcqacrllrk cyevgmmkqg vrkdiririlr rdkxrtqvqd qdkvvkqgeh  
ktvhydgrkr sstgggggggg ggrlsvtsip peqvllllqg aepplcsrcq klsrpypytevt  
mmtlltsmad kelvhmiawa kklpgflqls lhdqvllles swlevlmigl iwrssihcpk  
lifaqndlild rnegdcvegm teifdmllat asrfrvlkpk peefvclkai illnsgafsf  
ctgtmeplhn saavqsmldt itdalihyis qsgylaqeqa rrqaql111 shirhmsnk  
mehlysmkck nkvpolyd111 emldahrlhh pvrarpqslsq vdrdppstss ggggiapgsi  
sasrgriesp srgpfapsvl qyggssrpdt palqd

//

>>GSP:AAB20897 Oryzias lapites oestrogen receptor (575 aa)  
initn: 3905 init1: 3905 opt: 3905 Z-score: 2879.0 bits: 544.9 E(): 2.1e-152  
Smith-Waterman score: 3905; 99.478% identity (99.478% ungapped) in 575 aa overlap  
(210-1934:1-575)

210	240	270	300	330	360		
EP0111	MYPEESRGSGVAAVDLEGTYDYAAPNPATTPLYSQSSTGYYSAPLETNGPPSEGSLOQ	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	MYPEESRGSGVAAVDLLEGTYDYAAPNPATTPLYSQSSTGYYSAPLETNGPPSEGSLOQ	10	20	30	40	50	60
390	420	450	480	510	540		
EP0111	LGSGPTSPLVFVPSSPRLSPFMHPPSHYLETTSTPVYRSSHQGASREDQCGSREDTCSL	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	LGSGPTSPLVFVPSSPRLSPFMHPPSHYLETTSTPVYRSSHQGASREDQCGSREDTCSL	70	80	90	100	110	120
570	600	630	660	690	720		
EP0111	GELGAGAGAGGGFEMAKDTRFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPAT	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	GELGAGAGAGGGFEMAKDTRFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPAT	130	140	150	160	170	180
750	780	810	840	870	900		
EP0111	NQCTIDRNRRKSCQACRLRKCYEVGMMKGVRKDRIRILRRDKRRTGVGDGDKVVKGQEH	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	NQCTIDRNRRKGCQACRLRKCYEVGMMKGVRKDRIRILRRDKRRTGVGDGDKVVKGQEH	190	200	210	220	230	240
930	960	990	1020	1050	1080		
EP0111	KTVHYDGRKRSSTGGGGGGGGRLSVTSIPPEQVLLLQGAEPPIILCSRQKLSRPYTEVT	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	KTVHYDGRKRSSTGGGGGGGGRLSVTSIPPEQVLLLQGAEPPIILCSRQKLSRPYTEVT	250	260	270	280	290	300
1110	1140	1170	1200	1230	1260		
EP0111	MMTLLTSMADKELVHMIAWAKKLPGFLQLSLHDQVLLLESSWLEVLMIGLIWRSIHC PGK	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	MMTLLTSMADKELVHMIAWAKKLPGFLQLSLHDQVLLLESSWLEVLMIGLIWRSIHC PGK	310	320	330	340	350	360
1290	1320	1350	1380	1410	1440		
EP0111	LIFAQDLILDRNEGDCVEGMTEIFDMLLATASRFRVLKLKPEEFVCLKAIILLNSGAF SF	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	LIFAQDLILDRNEGDCVEGMTEIFDMLLATASRFRVLKLKPEEFVCLKAIILLNSGAF SF	370	380	390	400	410	420
1470	1500	1530	1560	1590	1620		
EP0111	CTGTMEPLHNSAAVQSMLETDITDALIHYISQSGYLAQEQRQAQPLLLL SHIRHMSNKG	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	CTGTMEPLHNSAAVQSMLETDITDALIHYISQSGYLAQEQRQAQPLLLL SHIRHMSNKG	430	440	450	460	470	480
1650	1680	1710	1740	1770	1800		
EP0111	MEHLYSMKCKNKVPLYDLLLEMIDAHRLHHPVRAPQQLSQVDRDPPSTSSGGGIAP GSI	:::::::	:::::::	:::::::	:::::::		
GSP:AA	MEHLYSMKCKNKVPLYDLLLEMIDAHRLHHPVRAPQQLSQVDRDPPSTSSGGGIAP GSI	490	500	510	520	530	540
1830	1860	1890	1920				
EP0111	SASRGRIESPSRGPFAPSVLQYGGSRPDCTPALQD	:::::::	:::::::				
GSP:AA	SASRGRIESPSRGPFAPSVLQYGGSRPDCTPALQD	550	560	570			